

Aus dem Botanischen Institut der Universität Freiburg  
und dem Institut für Entwicklungsphysiologie an der Universität Köln.

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VARIABILITÄT DER CHIASMENBILDUNG BEI OENOTHERA-BASTARDEN.

### I. Mitteilung.

#### DIE HÄUFIGKEIT DER ENDCHIASMEN BEI FORMEN MIT EINEM VIERERRING.

Von

CORNELIA HARTE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 25. Juli 1953.)

### A. Einleitung.

Die Chiasmenbildung zwischen den homologen Chromosomen in der Meiosis ist bereits vielfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Durch die Veröffentlichungen von OEHLKERS (ab 1935, zuletzt 1940) und Mitarbeitern ist bekannt, daß die Endchiasmen in der mittleren Diakinese bei *Oenothera* ein Maß für die in früheren Stadien gebildeten Chiasmen darstellen, und daß außerdem ihre Häufigkeit nicht konstant, sondern starken Veränderungen unterworfen ist. Dabei wurden die Unterschiede in der Chiasmenhäufigkeit vor allem unter experimentellen Bedingungen im Vergleich mit der Kontrolle geprüft; über die Variabilität unter natürlichen Verhältnissen ist bisher nur sehr wenig bekannt. Solange mit Schnittpräparaten gearbeitet wurde, ergab sich notwendigerweise, daß für jede Serie eine große Anzahl von Pflanzen herangezogen werden mußte, um den bei dieser Technik bedingten Ausfall durch sich vom Präparat ablösende oder angeschnittene Zellen auszugleichen. Da dies sowohl für Versuchs- wie für Kontrollmaterial gilt, war damit der Einfluß einer etwa vorhandenen individuellen Variabilität auf das Endergebnis weitgehend ausgeschaltet. Durch die Einführung der Quetschpräparate ist jedoch eine wesentlich bessere Auswertung des Materials möglich, was sich schon in der getrennten Auszählung jeder einzelnen Anthere bemerkbar macht. Durchschnittlich sind aus einer Anthere bei der neuen Technik weit mehr brauchbare Zellen zu gewinnen als früher aus einer ganzen Knospe. Da die Zahl der Zellen, die aus den einzelnen Präparaten und noch mehr aus jeder Knospe ausgewertet werden können, sehr variiert, ist damit die Gefahr gegeben, daß eine individuell verschiedene Reaktion einzelner Pflanzen oder ihrer Teile einen nennenswerten Einfluß auf das Versuchsergebnis gewinnt. Um diese Möglichkeit zu berücksichtigen, ist aber zunächst die Kenntnis

der natürlichen Variabilität der Chiasmenbildung und ihrer Ursachen notwendig. Die folgenden Untersuchungen wurden unter diesem Gesichtspunkt an mehreren *Oenothera*-Bastarden durchgeführt. Es wurden Formen mit einem Viererring und 5 Bivalenten gewählt, um gleichzeitig über die Verteilung der Endchiasmen auf diese Chromosomengruppen Aussagen machen zu können (Teil II).

## B. Material und Methode.

### 1. Zytologie.

Das Material für die Untersuchungen sind die PMZ aus fixierten Antheren von verschiedenen *Oenothera*-Bastarden. Zur Verwendung kam die  $F_1$  aus folgenden Kreuzungen:

Kreuzung	Komplexbkombination	Generation	Aufzuchtjahr
<i>Oe. franciscana</i> EMERSON und STURTEVANT $\times$ <i>Hookeri</i> DE VRIES	$^h\text{franciscana} \cdot ^h\text{Hookeri}$	$F_1$	1947
<i>Oe. Hookeri</i> $\times$ <i>Johannsen</i>	$^h\text{Hookeri} \cdot ^h\text{Johannsen}$	$F_1$	1947
<i>Oe. chicaginensis</i> $\times$ <i>Hookeri</i>	$^h\text{excellens} \cdot ^h\text{Hookeri}$	$F_1$	1947
<i>Oe. suaveolens sulfurea</i> $\times$ <i>Hookeri</i>	$^h\text{flavens} \cdot ^h\text{Hookeri}$	$F_1$	1943
<i>Oe. suaveolens sulfurea</i> $\times$ <i>strigosa</i>	$^h\text{flavens} \cdot ^h\text{stringens}$	$F_1$ und Folge- generationen	1937, 1938, 1939, 1940, 1943

Das Material von *flavens* · *stringens* aus den Aufzuchten von 1939 und 1940 wurde zum Teil bereits in einer früheren Veröffentlichung verwertet (HARTE 1942), wird hier aber unter anderen Gesichtspunkten nochmals herangezogen. Die meisten Fixierungen wurden an Freilandpflanzen vorgenommen. Die Pflanzen einer Kreuzung standen auf einem Beet zusammen und wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Die Fixierung erfolgte bis 1939 in BOUVIN-CLELAND, Verarbeitung als Schnittpräparate und Gentianaviolett-Färbung (GV), im übrigen immer mit Alkohol-Eisessig 2:1, Färbung mit Eisenkarmin (EK) und Verarbeitung als Quetschpräparate. Bei den Untersuchungen 1938—1943 wurden die Knospen von verschiedenen gleichartig behandelten Infloreszenzen einer Sorte zusammen fixiert; 1947 wurden dagegen ausschließlich Fixierungen von Einzelpflanzen vorgenommen, wobei für die Hauptinfloreszenz jeder Pflanze ein entsprechend nummeriertes Fixiergläschen verwendet wurde. Zum größten Teil wurde Freilandmaterial verwendet. Die experimentelle Behandlung erfolgte in der bereits beschriebenen Weise durch Naß- und Trockenkultur von Topfpflanzen und verschieden langem Aufenthalt in einer Kältekammer von  $+10^\circ\text{C}$ . Im folgenden ist jeweils angegeben, ob es sich um Freiland- oder Versuchspflanzen handelt.

Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte auf dem Versuchsgelände des Botanischen Instituts Freiburg, die zytologischen Untersuchungen im gleichen Institut in den Jahren 1938—1947. Die 4 Fixierungen des Jahres 1937 wurden von Herrn Prof. Dr. F. OEHLEKES aus seinem Material zur Verfügung gestellt, ebenso die Samen für die Aufzucht 1938 und die Ausgangspflanzen für die weiteren Kreuzungen. Für die freundliche Überlassung des Materials sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

## 2. Statistische Auswertung.

Die statistische Auswertung erfolgte zunächst durch Berechnung von Mittelwert, Streuung und mittlerem Fehler für jede Gruppe. Der Vergleich der Gruppen wurde nach 2 Methoden durchgeführt. Wenn es sich um die Differenz zwischen 2 Auszählungen handelte, wurde der *t*-Test verwendet und zu dem erhaltenen Wert für  $\text{Diff}/m_{\text{diff}}$  der zugehörige *P*-Wert in der Tafel von FISHER und YATES (1938) aufgesucht. Für die Untersuchung der Homogenität mehrerer Gruppen zusammen wurde die Varianzanalyse in der Modifikation für verschiedene Beobachtungszahlen in den einzelnen Gruppen (WEBER 1948) und die *F*-Tafel aus POST (1952) verwendet. Der  $\chi^2$ -Test, der an sich ebenfalls benutzt werden könnte, da es sich um Häufigkeitsvergleiche handelt, war nicht angezeigt, da bei der Klasseneinteilung gerade die wichtigen Extremklassen nur geringe Häufigkeiten aufweisen und durch eine Zusammenfassung bis zu Werten, die eine Anwendung des  $\chi^2$  erlauben, eine Ungenauigkeit in das Material hineingetragen würde, die sich durch die genannten Berechnungsweisen vermeiden ließ.

## C. Experimenteller Teil.

### I. Allgemeine Beobachtungen.

#### a) Die Anordnung der untersuchten Knospen an einer *Oenothera*-Pflanze.

Vor der Besprechung der einzelnen Ergebnisse muß auf die Methoden der Gewinnung und Auswertung der Versuchsdaten eingegangen werden. Die verwendeten *Oenothera*-Bastarde und ihre Stammarten sind morphologisch sehr einheitlich aufgebaut. Aus der zuerst gebildeten Blattrosette entwickelt sich ein Hauptsproß, der in einer traubigen Infloreszenz endet. An der Spitze werden während der Blütezeit laufend neue Knospen gebildet, so daß von jeder Pflanze im Freiland mehrere Fixierungen möglich sind. Aus den Achseln der Rosettenblätter entstehen zeitlich etwas nach dem Hauptsproß Seitentriebe, die sich zu langen Infloreszenzen entwickeln, deutlich schwächer sind als der Hauptsproß und weniger Blüten tragen. Sehr spät erst entstehen aus den Achseln der oberen Stengelblätter, dicht unter den ersten Blüten, kurze Seitentriebe, die nur wenige Blüten bilden und dann ihr Wachstum einstellen. Abb. 1 gibt eine schematische Darstellung dieses Aufbaues, dessen Kenntnis für einige der folgenden Untersuchungen wichtig ist. Tabelle 1 gibt zunächst einen Überblick über die untersuchten Bastarde und die im einzelnen durchgeführten Vergleiche.

#### b) Variabilität der Meiosisstadien innerhalb der Knospe.

Jede einzelne Knospe enthält 8 Antheren, die in ihrem Entwicklungszustand etwas variieren, ebenso wie auch nie alle PMZ einer Anthere sich im gleichen Stadium der Meiosis befinden. Die Variabilität ist jedoch sehr gering, so daß das gesuchte Stadium der Diakinese nur zusammen mit spätem Pachytän oder auch mit Metaphase I in einer Knospe oder Anthere vorkommen kann. Größere Stadienabweichungen wurden im Normalmaterial nie beobachtet und auch unter den verwendeten Versuchsbedingungen ist die Variabilität nur wenig größer. Hierdurch ist es bedingt, daß nie alle PMZ einer Anthere ausgewertet werden konnten, da nur die Zellen in der mittleren Diakinese für die Auszählungen verwertet wurden. Ebenso kommt es nur äußerst selten vor, daß sich in allen 8 Antheren einer Knospe geeignete PMZ vorfinden. Bei der Präparation wurde nicht auf die Lage der einzelnen Antheren in der Knospe geachtet; über das Stadienverhältnis benachbarter Antheren kann daher nichts ausgesagt werden. Ebenso läßt sich bei der angewendeten Quetschtechnik „oben“ und „unten“ der Antheren am fertigen

Präparat nicht unterscheiden. Es zeigt sich aber an allen Präparaten, daß die Zellen an einem Ende der Anthere sich in dem am weitesten fortgeschrittenen Stadium befinden. In Richtung zum anderen Ende folgen frühere Stadien der Meiosis.

Soweit die Anordnung der Loculi nach der Präparation noch erkennbar ist, was nur für einen kleinen Teil der Präparate zutrifft, weisen die beiden „inneren“ Loculi, die dem Konnektiv direkt benachbart sind, etwas spätere Stadien auf als die äußeren; dort ist die Meiosis am weitesten fortgeschritten. Die „äußeren“ Loculi zeigen einen geringen Stadienabstand. Das Gefälle liegt für alle Loculi einer Anthere in gleicher Richtung. In einem ziemlich großen Teil der Antheren verläuft diese Stadienverteilung in beiden Hälften genau parallel, bei den anderen

ist dagegen eine Antherenhälfte der anderen etwas voraus, wobei jedoch das Verhältnis der beiden Loculi jeder Hälfte zueinander und das innerhalb eines jeden Loculus gewahrt bleibt. Daraus ergibt sich, daß die Meiosis an einem Antherenende in den inneren Loculi zuerst beginnt; danach treten zum anderen Ende hin fortschreitend die benachbarten PMZ in die Teilung ein. Etwas später folgen die „äußeren“ Loculi. Ob der Vorgang an der Spitze oder an der Basis der Anthere einsetzt, konnte aus den genannten Gründen nicht festgestellt werden. Auf diese Verhältnisse ist es zurückzuführen, daß für einen Teil der Antheren aus beiden Hälften ausgewertete Zellen vorliegen, während für einen anderen Teil nur eine Hälfte verwendet werden konnte. Einige Bei-



Abb. 1. Schema des Aufbaues einer *Oenothera*-Pflanze.

spiele für diese Anordnung der einzelnen Stadien in den Antheren sind in Tabelle 2 gegeben, die sich auf die Verhältnisse bei *Hookeri* · *Johannsen* bezieht.

In den Präparaten, die PMZ in Diakinese enthalten, sind durchweg noch folgende Beobachtungen zu machen: auf die Zellen im Diplotän folgen einige Zellen in früher Diakinese, dann sehr viele in mittlerer Diakinese, mit völlig gleichartiger Ausbildung der Chromosomen, dann eine geringe Anzahl PMZ in später

Tabelle 1. Übersicht über die untersuchten *Oenothera*-Formen und die durchgeführten Vergleiche.

Komplexbombination	Summe der unter- suchten Zellen	Variabilitätsursache						
		inner- halb einer Anthere	inner- halb der Knospe, zwischen Antheren	inner- halb der Haupt- inflores- zenz, zwischen Knospen	zwischen großen und kleinen Seiten- inflores- zenzen	inner- halb einer Fixie- rungszeit, zwischen Pflanzen	zwischen verschiede- nen Fixierungen einer Pflanze	zwischen genetisch verschiede- nen Nach- kommen
<i>ranciocana</i> · <i>hHookeri</i>	7456	+	+	+	+	+	+	
<i>lookeri</i> · <i>hJohannsen</i>	8010	+	+	+		+		
<i>zellens</i> · <i>hHookeri</i> . .	163		+	+		+		
<i>vens</i> · <i>hHookeri</i> . .	571	+	+	+		+		
<i>vens-stringens</i> . .	2605		+	+		+		+
Σ	18 805							



Tabelle 2. Drei Beispiele für die Verteilung der Meiosisstadien innerhalb der Antheren.  
Material von *Oe. hHookeri* · *hJohannsen*.

1. Loculus	2. Loculus	Kon- nektiv ↓	3. Loculus	4. Loculus
Spätes Pachytän (wenige Zellen)	Diplotän (wenige Zellen)			Spätes Pachytän (wenige Zellen)
Diplotän	frühe Diakinese (wenige Zellen)		Diakinese	Diplotän
	mittlere Diakinese			
Diakinese	späte Diakinese (10 Zellen)		Metaphase I	Diakinese
Metaphase I	Metaphase I			Metaphase I

1. Loculus	2. Loculus	3. Loculus	4. Loculus
Pachytän	Diplotän	Diplotän	Pachytän
Diplotän	Diakinese	Diakinese	Diplotän
Diakinese (wenige Zellen)			Diakinese (wenige Zellen)

1. Loculus	2. Loculus	3. Loculus	4. Loculus
Pachytän	Diakinese	Diakinese	Pachytän
Diplotän	Metaphase I	Metaphase I	
Diakinese (wenige Zellen)			Diplotän

Diakinese, mit stark kontrahierten Chromosomen und beginnender Auflösung der Kernmembran, an die Zellen in Metaphase I anschließen. Die Kontraktion der Chromosomen zwischen Diplotän und Diakinese und dann wieder zwischen Diakinese und Metaphase I muß also sehr schnell verlaufen, während dazwischen eine Zeit hindurch keine nennenswerten Größenänderungen der Chromosomen erfolgen. Gleichartige Beobachtungen über Verteilung und Verlauf der Stadien wurden an allen Komplexkombinationen gemacht. Diese Befunde stimmen mit denen von LINNERT (1951) an *Oenothera* überein.

Bei der Fixierung von Einzelinfloreszenzen werden nicht an jeder Pflanze Knospen mit PMZ in auswertbaren Stadien gefunden. Da hier nur PMZ in mittlerer Diakinese verwendet werden können, ist der Ausfall an Pflanzen im Gegensatz zu einfachen Konfigurationsbestimmungen, bei denen auch frühe und späte Diakinese und Metaphase I gebraucht werden können, sehr groß. Vor allem wenn die gleichen Pflanzen an 2 Tagen vergleichend untersucht werden sollen, wie dies für die Kombination <sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri geschah, sind auch bei einer großen Anzahl von Fixierungen nur wenige Vergleichspaare zu erwarten, bei denen beide Proben genügend auswertbare PMZ enthalten.

### c) Chiasmenbildung und Endbindungswerte.

Wie bekannt, ist die Chromosomenzahl von *Oenothera*  $n=7$ ,  $2n=14$ . Die verwendeten Bastarde sind alle heterozygot für eine reziproke Translokation. In der Meiosis ergibt sich daraus eine Vierergruppe und 5 Bivalente. Da bei diesen *Oenothera*-Formen die Chiasmen während des Diplotäns alle terminalisieren, sind in der Diakinese die vorher gepaarten Chromosomen nur noch an den Enden verbunden. Bei einer Chiasmenbildung in allen Chromosomenschenkeln sind 14 Endbindungen möglich, 4 im Ring und 10 in den Bivalenten. Wenn in einzelnen Chromosomenschenkeln keine Chiasmen gebildet wurden, entstehen in der Diakinese als Folge davon „geöffnete Bindungen“ nach der Terminologie von OEHLKERS (1935). Die Chiasmenbildung kann also sowohl an den *vorhandenen* wie an den *ausgefallenen* Endbindungen gemessen werden. In Anlehnung an die Untersuchungen von OEHLKERS und Mitarbeitern wurde bei diesen Auszählungen die Häufigkeit der ausgefallenen („geöffneten“) Endbindungen je Zelle als Maß gewählt. Eine Umrechnung in Prozent, wie sie in den früheren Untersuchungen üblich war, wurde nur ausnahmsweise vorgenommen, da die gewählte statistische Auswertung sich mit den Originalzahlen besser durchführen ließ als mit relativen Werten, wie sie die Prozentzahlen darstellen. Die von RENNER (1948) genauer bearbeiteten „Querarme“ treten in der Diakinese als interstitielle, nicht vollständig terminalisierte Chiasmen in Erscheinung. Sie wurden nur in wenigen Zellen beobachtet. Diese vereinzelt Fälle wurden nicht gesondert ausgewertet, sondern das Chiasma wurde als Verbindung zwischen homologen Chromosomenenden einem terminalisierten Endchiasma gleichwertig erachtet, da durch die Untersuchungen an *Oenothera* und *Campanula* (OEHLKERS 1940 und früher, MARQUARDT 1937, JAFHA 1939, STRAUB 1937) ein solcher Zusammenhang erwiesen ist.

## II. Auszählungen der Endchiasmen.

### a) *Oe. (franciscana × Hookeri)* <sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri.

Von der Komplexkombination <sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri liegt das größte Material vor. Es handelt sich um 2 Fixierungen von Freilandpflanzen am 6. 7. und 7. 7. 47 und derselben Infloreszenzen am 16. 7. nach einem Aufenthalt von 2 Tagen in der Kältekammer von  $+10^{\circ}\text{C}$ ,

abgeschnitten auf 40 cm Länge, in Erlenmeyerkolben mit Leitungswasser.

Als erstes ist zu untersuchen, ob innerhalb einer Anthere alle Zellen sich gleichartig verhalten, oder ob sich hier Unterschiede in der Häufigkeit der Bildung der Endchiasmen zwischen verschiedenen Teilen der Anthere finden lassen. Für 18 Antheren war eine getrennte Auszählung aus den beiden Antherenhälften möglich (Tabelle 3). In 2 Fällen enthielt die eine Hälfte keine Zellen mit freien Enden, so daß hier der mittlere Fehler der Differenz nicht berechnet werden konnte. Für die übrigen 16 Fälle ergeben sich  $P$ -Werte, die über die ganze Skala verteilt sind. Eine leichte Häufung bei den niederen Werten unter  $P=0,2$  ist festzustellen, während in einem Fall  $P<0,001$  ist. Es handelt sich dabei um eine kleine Seiteninfloreszenz der Pflanze 9, bei der die beiden Antherenhälften mit 160 und 152 Zellen die Mittelwerte  $0,41 \pm 0,06$  und  $0,12 \pm 0,02$  ergaben.

Aus dem Material ist zu erkennen, daß im allgemeinen eine gute Übereinstimmung in der Häufigkeit der Endchiasmen zwischen den Hälften einer Anthere besteht, aber die Verteilung läßt doch vermuten,

Tabelle 3. Verteilung der  $P$ -Werte für die Differenz des Bindungsausfalls zwischen Antherenhälften.

	P-Werte									
	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
<i>hfranciscana</i> · <i>hHookeri</i>	2	1	1	1	1	—	1	—	4	5
<i>hHookeri</i> · <i>hJohannsen</i>	2	1	1	1	6	4	2	2	1	3
Summe	4	2	2	2	7	4	3	2	5	8
Gefunden . . . . .	6		4		11		5		13	
Erwartung . . . . .	7,8		7,8		7,8		7,8		7,8	
Abweichung . . . . .	—1,8		—3,8		+3,2		—2,8		+5,2	
	$\chi^2 = 8,0510$ $n = 4$ $P = 0,1 - 0,05$									

daß bei einem größeren Material sehr niedrige  $P$ -Werte mit einer Häufigkeit vorkommen könnten, die nicht mehr zufällig ist. Mit dem öfteren Auftreten statistisch gesicherter Differenzen zwischen Antherenhälften, wie sie hier in einem Fall gefunden wurde, muß daher gerechnet werden. Vorläufig bestehen jedoch keine Bedenken, die Auszählungen aus verschiedenen Teilen einer Anthere als homogen zu betrachten und zusammenzufassen.

In 22 Knospen enthielten mehrere Antheren eine genügende Anzahl von PMZ, die für eine Auszählung geeignet waren. Bei 19 Knospen liegen die  $P$ -Werte dabei über 0,05, für 2 zwischen 0,05 und 0,01, für eine dagegen so weit unterhalb 0,01, daß diese Abweichung nicht zufällig sein kann. Es handelt sich dabei um die Knospe B der Pflanze 8, die in 8 Antheren insgesamt 725 Zellen enthielt, und die nach 2 Tagen Behandlung mit  $10^6$  C als abgeschnittene Infloreszenz fixiert wurde. Knospe A derselben Pflanze, die genau gleichzeitig fixiert wurde, weist dagegen in 5 Antheren mit insgesamt 478 Zellen eine gute Homogenität auf (Tabelle 4).

Tabelle 4. *Oe. (franciscana × Hookeri) h. franciscana · h. Hookeri.*

Vergleich des Bindungsausfalls zwischen den Antheren und zwischen den Knospen der Pflanze Nr. 8 (Mittelwert = ausgefallene Bindungen je Zelle).

	Anthere-Nr.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Knospe A { Zahl der Zellen. . . . .	89	41	69	261	18	—	—	—
{ Mittelwert . . . . .	0,09	0,12	0,12	0,06	0,0	—	—	—
Knospe B { Zahl der Zellen. . . . .	16	196	151	18	47	7	1	289
{ Mittelwert . . . . .	0,31	0,28	0,15	0,06	0,13	0,0	0,0	0,06
								$\Sigma$
								$\left. \begin{matrix} 478 \\ 0,08 \end{matrix} \right\} n=1303$
								$M=0,12 \left\{ \begin{matrix} 725 \\ 0,15 \end{matrix} \right.$

## Endanalysen.

Variationsursache	Summe der A Q	Freiheitsgrade	$\sigma^2$	F-berechnet	F-Grenzwerte		P
					$P = 0,05$	$P = 0,01$	
Knospe 8 A { Zwischen Antheren . . . . .	3,7334	4	0,9333	1,008	2,39	3,40	> 0,05
{ Innerhalb der Antheren . . . . .	43,7631	473	0,9252				
{ Total	46,4965	477					
Knospe 8 B { Zwischen Antheren . . . . .	6,1145	7	0,8735	4,504	2,02	2,86	< 0,01
{ Innerhalb der Antheren . . . . .	139,0909	717	0,1939				
{ Total	145,2054	724					

Differenz A/B =  $0,07 \pm 0,02$ ; Diff/mitt = 3,235;  $P = 0,01-0,001$ .

Der Vergleich zwischen den Antheren einer Knospe zeigt also, daß auch hier im allgemeinen das Material homogen ist, aber in nicht sehr seltenen Ausnahmefällen können gesicherte Unterschiede auftreten.

An 6 Hauptinfloreszenzen wurden 2 Knospen mit PMZ in Diakinese gefunden. Hier ist die Übereinstimmung sehr gut mit  $P$ -Werten zwischen 1 und 0,4. Bei einer Pflanze war die Berechnung der Homogenität nicht möglich, da eine der beiden Knospen nur wenige PMZ im richtigen Stadium enthielt, unter denen der Bindungsausfall 0 war. Für eine weitere Pflanze ist die Differenz zwischen 2 Knospen mit  $P = 0,01$  bis 0,001 gut gesichert. Es betrifft hier die beiden Knospen der bereits erwähnten Pflanze 8 (Versuchsfixierung) mit den Mittelwerten  $M = 0,08 \pm 0,01$  für Knospe A und  $M = 0,15 \pm 0,02$  für Knospe B.

Genauer untersucht wurde Pflanze Nr. 9 (Freilandfixierung vom 16. 7.). Der Hauptsproß ergab keine brauchbaren Knospen, aber mehrere kleine Seiteninfloreszenzen stimmten in ihren Endbindungen gut überein ( $M = 0,17$  und  $0,15$ ,  $P = 0,5-0,4$ ). Zwischen einer großen Seiteninfloreszenz und der Summe der kleinen Zweige war kein Unterschied festzustellen ( $M = 0,161$  und  $0,164$ ,  $P = 0,95-0,9$ ). Zwischen mehreren großen Seiteninfloreszenzen der Pflanze 4 ist die Übereinstimmung nicht sehr gut, wenn sie auch noch gerade zufallsgemäß sein kann ( $M = 0,02$  und  $0,06$ ,  $P = 0,05-0,02$ ).

Für die 3 Fixierungstage wurde innerhalb jedes dieser Tage die Homogenität zwischen den Auszählungen der einzelnen Pflanzen bestimmt. Für den 6. 7. (4 Pflanzen) ergibt sich ein  $P$ -Wert zwischen 0,05 und 0,01, der aber nahe an der unteren Grenze liegt. Für den 7. 7. (ebenfalls 4 Pflanzen) und den Versuchstag 16. 7. (9 Pflanzen) besteht eine sehr deutliche Inhomogenität mit  $P$  weit unter 0,01 (Tabelle 5). Dies heißt aber, daß an allen Tagen, unabhängig von Versuchs- oder Freilandbedingungen, die einzelnen Pflanzen gesicherte Differenzen der Endbindungshäufigkeit aufweisen. Zwischen den Seiteninfloreszenzen der Pflanze 9 ( $M = 0,16$ ) und 4 ( $M = 0,04$ ) trat eine gesicherte Differenz auf ( $P < 0,001$ ). Dies entspricht genau den Befunden der Hauptinfloreszenzen von verschiedenen Pflanzen des gleichen Fixierungstages, bei denen ebenfalls gesicherte Unterschiede nachgewiesen werden konnten.

Die beiden Freilandfixierungen von aufeinanderfolgenden Tagen (6. 7. und 7. 7.) unterscheiden sich sehr deutlich, wenn nur die Summen der Fixierungen berücksichtigt werden ( $t$ -Test,  $P < 0,001$ ). Für diesen Fall ist aber der Vergleich der Summen nicht ganz korrekt, da sich jede aus den Werten von 4 einzelnen Pflanzen zusammensetzt und nicht nur zu entscheiden ist, ob sich die Summen unterscheiden, sondern auch, ob die Differenzen zwischen den Tagen größer sind als bei der gegebenen Variabilität zwischen den Pflanzen und zufallsgemäßer Auswahl der

Tabelle 5. *Oe. (franciscana × Hookeri) <sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri.*  
 Vergleich des Bindungsausfalls zwischen Pflanzen eines Versuchstages.

	Nr. der Pflanze				$\Sigma$
	1	4	5	6	

Tag: 6. 7. 47.

Zahl der Zellen	479	137	988	275	1879
Mittelwert . .	0,054	0,058	0,024	0,036	0,044

	Nr. der Pflanze				$\Sigma$
	15	16	17	24	

Tag: 7. 7. 47.

Zahl der Zellen	19	133	182	63	397
Mittelwert . .	0,105	0,007	0,038	0,794	0,151

	Nr. der Pflanze								$\Sigma$
	2	8	9	15	16	17	24	25	26

Tag: 16. 7. 47.

Zahl der Zellen	744	1203	153	392	10	309	307	289	27	3434
Mittelwert . .	0,187	0,119	0,131	0,128	0,200	0,058	0,055	0,082	0,111	0,121

## Endanalysen.

Variationsursache	Summe der A Q	Freiheits- grade	$\sigma^2$	F-berech- net	F-Grenzwerte	
					P=0,05	P=0,01

Tag: 6. 7. 47.

Zwischen Pflanzen . . .	0,5004	3	0,1667	3,367	2,60	3,78
Innerhalb der Pflanzen	92,8288	1875	0,0495			
Total	93,3292	1878				

Tag: 7. 7. 47.

Zwischen Pflanzen . . .	31,1100	3	10,37	58,3	2,65	3,88
Innerhalb der Pflanzen	69,8260	393	0,1776			
Total	100,9360	396				

Tag: 16. 7. 47.

Zwischen Pflanzen . . .	6,6442	8	0,8305	5,5	1,95	2,53
Innerhalb der Pflanzen	514,1617	3425	0,1515			
Total	520,8059	3433				

Individuen erwartet werden kann. Wie die Varianzanalyse (Tabelle 6) zeigt, ist die Differenz zwischen den Pflanzen insgesamt sehr gut gesichert, die Varianz zwischen den Tagen ist aber nicht größer als innerhalb der Tage. Der gefundene Unterschied ist also nicht auf die Wirkung unbekannter Ursachen zurückzuführen, die an beiden Tagen



Tabelle 6. Varianzanalyse für den Vergleich von Freilandfixierungen an 2 Tagen.

Variationsursache	Summe der A Q	Freiheits- grade	$\sigma^2$	F-berech- net	F-Grenzwert 99 % bzw. P
Zwischen den Tagen . . .	3,7587	1	3,7587	0,7	5859
Innerhalb der Tage. . . .	30,2474	6	5,0412		$P > 0,05$
Zwischen den Pflanzen . .	34,0061	7	4,8580	66,3	2,64
Innerhalb der Pflanzen . .	166,0177	2268	0,0732		$P < 0,001$
Total	200,0238	2275	0,0879		

verschieden waren, sondern entsteht durch die zufällige Kombination stark variierender Pflanzen. Zum exakten Nachweis von Tagesdifferenzen müßte demnach ein Material zur Verfügung stehen, das groß genug ist, um den Zufallswirkungen bei der Pflanzenauswahl keinen Einfluß auf das Ergebnis mehr einzuräumen.

Ebenso ist das Gesamtergebnis der Fixierungen vom 6. 7. (Freiland) und 16. 7. (Kältekammer) mit dem *t*-Test gesichert verschieden. Für die Gesamtdifferenz zwischen dem 7. 7. und 16. 7., wobei die gleichen Pflanzen an beiden Tagen fixiert wurden, ergibt sich nur  $P = 0,2-0,1$ . Der Bindungsausfall ist zwar am Versuchstag insgesamt höher als bei der Freilandfixierung, aber die Differenz ist nicht gesichert. Es sieht danach aus, als ob die Behandlung keinerlei Einfluß gehabt hätte. Dies Bild ändert sich aber, wenn das Material in die einzelnen Gruppen zerlegt wird, so daß für jede Pflanze die beiden Fixierungen aus dem Freiland und der Kältekammer verglichen werden. In der Bildung derartiger Vergleichspaare ist eine andere Möglichkeit gegeben, den Einfluß der Pflanzendifferenzen auszuschalten.

Bei 4 Pflanzen wurden sowohl in der Freilandfixierung vom 7. 7. wie im Versuchsmaterial vom 16. 7. genügend geeignete Zellen gefunden, um einen solchen Vergleich zu ermöglichen. Bei den Pflanzen Nr. 16 und 24 ist die Differenz mit  $P < 0,001$  sehr gut gesichert, für Nr. 17 ( $P = 0,3-0,2$ ) und Nr. 15 ( $P = 0,8-0,7$ ) dagegen nicht. Die Teilgruppen verhalten sich demnach nicht einheitlich und anders als das Gesamtmaterial. Die genauere Betrachtung der Daten zeigt aber noch weitere interessante Gegebenheiten auf. Die Freilandfixierungen lassen eine deutliche Serrierung der 4 Pflanzen nach der Endbindungshäufigkeit zu. Die Werte des Versuchstages ergeben genau die gleiche Reihenfolge. Die Größe der Differenzen ändert sich in der Weise (Tabelle 7), daß dem höchsten Bindungsausfall im Freiland eine negative Differenz zum Versuchstag hin zugeordnet ist. Bei den Pflanzen mit geringerem Bindungsausfall wird diese Differenz positiv und nimmt an Größe zu, je kleiner der Freilandwert war. Dabei zeigt Pflanze 16, die im Freiland einen sehr geringen Bindungsausfall aufwies, auch unter Versuchsbedingungen einen relativ niedrigen Wert, der aber doch einen sehr

Tabelle 7. *Oe. (franciscana × Hookeri)* <sup>1</sup>*franciscana* · <sup>2</sup>*Hookeri*.  
Vergleich des Bindungsausfalls für 4 Pflanzen an 2 Tagen unter verschiedenen äußeren Bedingungen.

Pflanze Nr.	Mittelwert		Differenz	m <sub>DIR</sub>	D/m <sub>D</sub>	P
	7. 7.	16. 7.				
24	0,794	0,200	—0,594	0,177	3,354	<0,001
15	0,105	0,127	+0,022	0,073	0,305	0,8—0,7
17	0,038	0,111	+0,073	0,062	1,171	0,3—0,2
16	0,0075	0,0815	+0,074	0,019	3,854	<0,001

gut gesicherten Anstieg um mehr als das 10fache darstellt. Pflanze Nr. 17 mit den nächst höheren Werten zeigt zwischen Kontrolle und Versuch eine geringe Differenz, die als Einzelwert nicht gesichert ist. Bei Pflanze 15, die noch höhere Werte aufweist, ist der Anstieg in der Versuchsserie kaum merklich. Die Pflanze 24 schließlich, für die im Freiland ein extrem hoher Bindungsausfall zu verzeichnen ist, zeigt im Versuch auch noch den höchsten Wert, aber bei einer Verminderung auf etwa  $\frac{1}{4}$  ist die Differenz negativ geworden. Unter den Versuchsbedingungen ist das Material gegenüber dem Freiland einheitlicher geworden. Bei einer allgemeinen Tendenz zur Erhöhung des Bindungsausfalls sind die Extremwerte einander genähert, ohne aber zu einem Ausgleich zu kommen.

b) *Oe. (Hookeri × Johannsen)* <sup>1</sup>*Hookeri* · <sup>2</sup>*Johannsen*.

Für diesen Bastard liegt eine Freilandfixierung vom 16. 7. 47 vor. Der Vergleich innerhalb der Antheren konnte hier noch weiter durchgeführt werden als bei <sup>1</sup>*franciscana* · <sup>2</sup>*Hookeri*, da an zwei besonders günstigen Präparaten die PMZ der beiden Loculi einer Antherenhälfte getrennt ausgezählt werden konnten. In beiden Fällen waren die Ergebnisse homogen mit  $P=0,2-0,1$  bei  $M=0,05$  und  $0,08$  für 108 und 217 Zellen und  $P=0,3-0,2$  bei  $M=0,10$  und  $0,04$  für 55 und 65 Zellen.

Für den Vergleich der Antherenhälften stehen 23 Antheren zur Verfügung (Tabelle 3). In keinem Fall wurde eine gesicherte Differenz gefunden, aber wohl zeigte sich die gleiche Erscheinung wie bei der zuerst besprochenen Kombination, nämlich eine Verschiebung zu den niedrigen  $P$ -Werten hin. Die Abweichung von der erwarteten Verteilung ist zwar durch die geringe Anzahl von Antheren, bei denen beide Hälften PMZ in Diakinese enthielten, nicht zu sichern, ist aber doch verdächtig, so daß bei einer Vergrößerung des Materials damit gerechnet werden muß, daß eine Differenz im Bindungsverhalten der beiden Antherenhälften auftreten könnte.

Für den Vergleich zwischen Antheren einer Knospe stehen 7 Fälle zur Verfügung. An 2 Knospen wurden je 3 Antheren ausgezählt, für die restlichen Knospen

Tabelle 8. *Oe. (Hookeri × Johannsen) <sup>h</sup>Hookeri · <sup>h</sup>Johannsen.*Vergleich des Bindungsausfalls zwischen Antheren innerhalb einer Knospe.  
Freilandfixierung 16. 7. 47.

	Pflanze und Knospe						
	1 A	2	4 A	4 B	5 B	6 A	6 B
	Zahl der Antheren						
	6	3	5	8	6	3	7
Extreme der	0,052	0,067	0,053	0,033	0,0	0,071	0,052
Mittelwerte	0,172	0,193	0,184	0,156	0,105	0,129	0,142
F-berechnet	0,827	1,638	2,156	2,126	0,92	2,48	1,07
$P_{\text{hom}}$ . . . . .	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,05—0,01	< 0,05	> 0,05	> 0,05

Tabelle 9. *Oe. (Hookeri × Johannsen) <sup>h</sup>Hookeri · <sup>h</sup>Johannsen.*

Vergleich des Bindungsausfalls zwischen den Knospen einer Pflanze.

Pflanze		Zellen mit ausgefallenen Endbindungen				N	M	Differenz	m <sub>DN</sub>	D/m <sub>D</sub>	P
Nr.	Knospe	0	1	2	3						
4	A	1213	104	5	—	1322	0,086	0,005	0,011	0,424	0,7—0,6
	B	1343	96	11	—	1450	0,081				
5	A	63	7	—	—	70	0,100	0,019	0,037	0,521	0,6—0,5
	B	1049	88	2	—	1139	0,081				
6	A	641	60	3	—	704	0,094	0,002	0,014	0,134	0,9—0,8
	B	1280	120	3	1	1404	0,092				

konnten 5—8 Antheren ausgewertet werden. Die statistische Auswertung ergibt nur für eine Knospe  $P=0,05—0,01$ , für die anderen höhere Werte. In keinem Fall liegt also eine gesicherte Differenz vor (Tabelle 8).

Drei Pflanzen hatten je 2 auswertbare Knospen, die alle  $P$  Werte über 0,5 für die Homogenität innerhalb der Pflanze zwischen den Knospen ergaben (Tabelle 9).

Bei *<sup>h</sup>Hookeri · <sup>h</sup>Johannsen* liegen innerhalb einer Pflanze in keinem Fall gesicherte Differenzen vor. Um so auffallender sind die Unterschiede zwischen den 5 Pflanzen, die mit  $P < 0,01$  sehr gut gesichert sind. Die Mittelwerte von 3 Pflanzen liegen sehr dicht beisammen mit  $M=0,08$  und 0,09 ausgefallenen Bindungen je Zelle, während die beiden anderen Pflanzen mit  $M=0,13$  und 0,16 davon abweichen (Tabelle 10). Zwischen den Pflanzen, die auf dem Versuchsbeet sehr eng benachbart standen, müssen also physiologische Unterschiede vorhanden sein, die für diese Differenzen verantwortlich sind. Eine weitere Ausdeutung der Befunde, wie sie bei *<sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri* durch die Heranziehung von Versuchsmaterial gegeben war, ist hier nicht möglich.

c) *Oe. (chicaginesis × Hookeri) excellens · <sup>h</sup>Hookeri.*

Von dieser Kombination liegen von 2 Pflanzen insgesamt 4 Knospen vor von abgeschnittenen Infloreszenzen, die bei 10° C 36 Std in der Kältekammer gestanden

Tabelle 10. *Oe. (Hookeri*  $\times$  *Johannsen)* <sup>a</sup>*Hookeri*  $\cdot$  <sup>a</sup>*Johannsen*.  
Vergleich des Bindungsausfalls zwischen Pflanzen.

Pflanze Nr.	Zellen mit n ausgefallenen Endbindungen				N	M
	0	1	2	3		
1	1221	153	18	3	1395	0,142
2	475	48	8	—	531	0,121
4	2556	200	16	—	2772	0,084
5	1112	95	2	—	1209	0,082
6	1921	180	6	1	2108	0,093
$\Sigma$	7285	676	50	4	8015	0,098

## Endanalyse.

Variationsursache	Summe der A Q	Freiheits- grade	$\sigma^2$	F-be- rechnet	F-Grenzwerte	
					P = 0,05	P = 0,01
Zwischen Pflanzen. . .	3,9172	4	0,9793	9,452	2,37	3,32
Innerhalb der Pflanzen	830,6348	8010	0,1036			
Total	834,5520	8014				

hatten. Die Antheren enthielten jeweils nur wenige PMZ in geeigneten Diakinese-stadien. Innerhalb der Knospen A und C der Pflanze 8 sind die einzelnen Antheren homogen, während für Knospe B die 3 Antheren trotz der sehr geringen Zellenzahl einen sehr gut gesicherten Unterschied aufweisen ( $M = 0,40, 1,60$  und  $2,56$ ). Auch hier können also innerhalb einer Pflanze gesicherte Differenzen der Endchiasmenhäufigkeit auftreten. Die 3 Knospen dieser Pflanze zeigen eine deutliche Differenz mit  $P < 0,001$  ( $M = 0,75, 1,58$  und  $1,27$ ). Zwischen dem Gesamtergebnis der Pflanzen Nr. 3 und 8 ist der Unterschied zwischen den Mittelwerten  $M = 0,96$  (Pflanze 3) und  $M = 1,27$  (Pflanze 8) mit  $P = 0,2-0,1$  nicht gesichert, was zum größten Teil der sehr geringen Zellenzahl bei Pflanze 3 zuzuschreiben ist.

d) *Oe. (suaveolens sulfurea*  $\times$  *Hookeri)* *flavens*  $\cdot$  <sup>a</sup>*Hookeri*.

Für *flavens*  $\cdot$  <sup>a</sup>*Hookeri* steht eine Sammelfixierung aus 7 großen Seiteninfloreszenzen zur Verfügung, die abgeschnitten 36 Std in der Kältekammer bei  $10^0$  C gestanden hatten. Zwei Knospen mit 1 und 4 Antheren waren auswertbar.

Zur Untersuchung der Homogenität innerhalb einer Anthere wurde hier ein anderer Weg eingeschlagen als bei den vorher besprochenen Fällen. In der Anthere aus Knospe B wurden die 180 auswertbaren Zellen nach der Reihenfolge ihrer Auszählung in 3 Gruppen zu je 60 Zellen zusammengefaßt. Die Mittelwerte zeigten mit  $M = 1,50, 1,42$  und  $1,27$  ausgefallenen Bindungen je Zelle eine gute Übereinstimmung. Zwei Gruppen von 60 Zellen aus Anthere 4 der Knospe A wiesen beide den Mittelwert  $M = 0,95$  auf. In Anthere 2 derselben Knospe ist dagegen die Differenz zwischen den Mittelwerten der Gruppen ( $M = 1,38$  und  $0,73$ ) mit  $P < 0,001$  ( $\text{Diff}/m_{\text{diff}} = 3,047$ ) sehr gut gesichert.

Innerhalb der Knospe A sind die 4 Antheren homogen ( $P > 0,05$ ). Beim Vergleich der Summe der Knospen A und B ergibt sich mit  $P = 0,001$  ( $\text{Diff}/m_{\text{diff}} = 3,066$ ) eine gesicherte Differenz zwischen den Mittelwerten  $1,01 \pm 0,05$  (aus 391 Zellen) und  $1,39 \pm 0,11$  (aus 180 Zellen). Da an Seiteninfloreszenzen, auch wenn

sie sehr groß sind, nie 2 Knospen im gleichen Stadium der Meiosis gefunden wurden, entsprechen diese beiden Knospen verschiedenen Infloreszenzen, wahrscheinlich von verschiedenen Pflanzen.

Zusammenfassend läßt sich über die Auszählungen sagen, daß bei *flavens* · *Hookeri* innerhalb einer Anthere meist gleichartige Verhältnisse vorliegen, aber doch auch gesicherte Differenzen auftreten können. Innerhalb der Knospe verhalten sich die Antheren gleichartig, zwischen den Knospen verschiedener Infloreszenzen besteht dagegen keine Übereinstimmung.

e) *Oe. (suaveolens sulfurea* × *strigosa*) *flavens* · *stringens*.

Diese Komplexkombination wurde in mehreren Jahren und unter sehr verschiedenartigen Versuchsbedingungen beobachtet.

Eine Sammelfixierung von Feldmaterial (6. 7. 43) ergab 2 Knospen mit 2 und 3 Antheren. Sowohl innerhalb der Knospen wie zwischen den Knospen besteht eine gute Übereinstimmung der Mittelwerte (Tabelle 11). Von 1940 liegt Versuchsmaterial vor von trocken und naß kultivierten Pflanzen. Innerhalb der Knospen ist die Homogenität wiederum gegeben, ebenso zwischen den beiden Knospen des Naß-Versuchs ( $P=0,05-0,02$ ). Die Mittelwerte sind hier  $M=0,64$  bei 165 Zellen und 0,86 bei 115 Zellen,  $D/m_d=2,28$ ,  $P=0,05-0,02$ . Im Trockenversuch stimmen beide Knospen ebenfalls überein ( $M=1,07$  bei 145 Zellen und  $M=0,84$  bei 55 Zellen;  $D/m_d=2,08$ ;  $P=0,05-0,02$ ). Derselbe Versuch 1939 ergab nicht genügend Präparate, um einen entsprechenden Vergleich durchführen zu können. Die Auswertung im Hinblick auf die Wirkung der Kulturbedingungen erfolgte bereits früher (HARTE 1942).

Außer den Beobachtungen an der  $F_1$  der Kombination *flavens* · *stringens* liegt noch weiteres Material vor aus Folgegenerationen dieser Kreuzung, die als  $F_x$  zusammengefaßt werden. Diese Untersuchungen zielten vor allem darauf ab, einen etwaigen Unterschied im Bindungsverhalten genetisch verschiedener Pflanzen zu erfassen.

Es handelt sich um Schnittpräparate mit GV-Färbung aus Sammelfixierungen. Eine Prüfung der Homogenität innerhalb der Knospen entfällt damit, jedes Präparat entspricht einer Knospe. Jede Fixierung enthält gelbblütige Geschwisterpflanzen des gleichen Phänotyps, von denen ihrer Herkunft nach eine gewisse

Tabelle 11. *Oe. (suaveolens sulfurea* × *strigosa*) *flavens* · *stringens*  $F_1$ .  
Vergleich des Bindungsausfalls zwischen Antheren einer Knospe und zwischen Knospen. Freilandfixierung 1943.

	Anthere							$\Sigma$ <i>A + B</i>
	Knospe A				Knospe B			
	1	2	4	$\Sigma$	1	2	$\Sigma$	
Zahl der Zellen .	16	50	60	126	41	33	74	200
Mittelwert . . .	2,19	1,44	1,85	1,73	2,05	1,48	1,79	1,76
Diff./mittl. . . .	1,348				1,46			A/B 0,26
P . . . . .	0,2—0,1				0,2—0,1			0,8

genetische Einheitlichkeit angenommen werden konnte. Meist war nur eine Knospe auswertbar, aber innerhalb von 8 Fixierungen, die 2 oder mehr gute Knospen enthielten, waren die Ergebnisse einheitlich. Die 7 Präparate der Fixierung 1938—46 sind dagegen gesichert inhomogen mit  $P < 0,001$  (Tabelle 12).

Die Zusammenfassung nach genetisch verschiedenen Gruppen ergab keine Beziehung zur Blattbreite, dagegen deutliche Unterschiede zwischen fertilen und pollensterilen Pflanzen (Tabelle 13). Für 1937 ist die Homogenität innerhalb je zwei Fixierungen für „fertil“ und „steril“ gut. Die Fertilen zeigen einen höheren Bindungsausfall als die Sterilen, der aber bei der relativ geringen Zellenzahl nicht gesichert ist. Für 1938 liegen Werte von 3 Fixierungstagen vor. Für den 4. 8. und 16. 8. ist je ein Vergleichspaar vorhanden, wobei die Differenzen nicht gesichert sind, am 4. 8. wegen der sehr geringen Beobachtungszahl von nur 4 Zellen für die Pollensterilen. Für den 27. 7. konnte dagegen eine größere Anzahl von Fixierungen ausgewertet werden, so daß hier eine genügende Zellenzahl vorliegt. Der Vergleich der Mittelwerte der

Tabelle 12. *Oe. (suaveolens sulfurea × strigosa) flavens · stringens* F<sub>2</sub>.

Prüfung der Homogenität innerhalb der Fixierung 1938, Nr. 46. Schnittpräparate von Freilandpflanzen, jedes Präparat = 1 Knospe.

	Präparat Nr.							Σ
	1	2	3	4	5	6	7	
Zahl der Zellen . .	27	16	31	13	9	2	35	133
Mittelwert . . . . .	0,44	0,63	0,81	0,54	0,22	0,0	0,17	0,47

## Endanalyse.

Variationsursache	S. q. A.	Freiheitsgrade	σ <sup>2</sup>	F-be-rechnet	F-Grenzwerte	
					P = 0,05	P = 0,01
Zwischen Knospen . .	7,7749	6	1,2958	5,472	2,19	2,99
Innerhalb der Knospen	29,8454	126	0,2368			
Total	37,6203	132				

Tabelle 13. *Oe. (suaveolens sulfurea × strigosa) flavens · stringens* F<sub>2</sub>.

Vergleich des Bindungsausfalls bei fertilen und pollensterilen Pflanzen.

Vergleichsgruppe	Fertil		Pollensteril		Differenz	m/Diff	D/m D	P
	n	M	n	M				
1937	200	0,740	116	0,543	0,197	0,105	1,875	0,1—0,05
27. 7. 1938	513	0,651	378	0,471	0,180	0,055	3,296	< 0,001
4. 8. 1938	234	0,654	4	(0,75)	0,096	0,652	0,148	0,9—0,8
16. 8. 1938	357	1,014	54	1,018	0,004	0,134	0,028	0,98—0,95
Σ 1938	1105	0,770	436	0,537	0,233	0,048	4,903	< 0,001
Total	1305	0,766	552	0,515	0,228	0,041	5,562	< 0,001



Fertilen und Pollensterilen ergibt  $D/m_d = 3,30$  und  $P < 0,001$ . An diesem Fixierungstag besteht innerhalb der Vergleichsgruppe „Pollensteril“ eine gute Homogenität zwischen den Einzelfixierungen ( $P < 0,05$ ), während bei den „Fertilen“ größere Differenzen vorliegen ( $P > 0,01$ ). Zwischen den 3 Fixierungstagen ergeben sich sehr starke Differenzen, obwohl teilweise die gleichen Pflanzen verwendet wurden. Die Werte für den 16. 8. liegen wesentlich höher als für den 27. 7., wie aus Tabelle 13 und 14 ersichtlich ist. Innerhalb der beiden Gruppen der fertilen und pollensterilen Pflanzen ergibt sich dadurch bei der Zusammenfassung aller Auszählungen dieses Jahres eine gesicherte Inhomogenität mit  $P < 0,001$ .

Die gemeinsame Auswertung aller Fixierungen von fertilen und pollensterilen Pflanzen des Jahres 1938 ergibt, ebenso wie bei Hinzuziehung der Ergebnisse von 1937, eine sehr gute Sicherung der Differenz zwischen den beiden Gruppen. Daß diese in einigen Einzelgruppen nicht zu sichern ist, wenn sie auch überall in der gleichen Richtung liegt, beruht demnach nicht auf einem andersartigen Verhalten einiger Fälle, sondern auf der für ihren Nachweis nicht ausreichenden Zellenzahl. Da beide Gruppen durch die Zusammenfassung von mehreren Fixierungen, die jeweils eine größere Anzahl von Pflanzen umfaßten, entstanden, kann angenommen werden, daß die Variabilität zwischen den Antheren, Knospen und Pflanzen, die bei den anderen Kombinationen nachgewiesen wurde, in beiden Gruppen gleich groß war und dadurch auf das Endergebnis keinen Einfluß nehmen konnte. Es ergibt sich

Tabelle 14. *Oe. (suaveolens sulfurea × strigosa) flavens · stringens*.  
Prüfung der Homogenität zwischen genetisch. einheitlichen Gruppen.

	Variationsursache	Summe der A Q	Freiheitsgrade	$\sigma^2$	F-be-rechnet	F-Grenzwerte	
						P = 0,05	P = 0,01
Fertile Pflanzen.							
Fixierungen vom 27. 7. 38	Zwischen Gruppen .	13,4436	5	2,688	3,266	2,22	3,04
	Innerhalb der Gruppen	412,6717	508	0,8123			
	Total	426,0153	513				
Alle Fixierungen von 1938	Zwischen Gruppen .	42,9493	7	6,1356	6,394	2,02	2,06
	Innerhalb der Gruppen	1052,6752	1097	0,9595			
	Total	1095,6245	1104				
Pollensterile Pflanzen.							
Fixierungen vom 27. 7. 38	Zwischen Gruppen .	0,2665	3	0,0888	0,167	8,53	26,12
	Innerhalb der Gruppen	198,2333	374	0,5300			
	Total	198,4998	377				
Alle Fixierungen von 1938	Zwischen Gruppen .	16,7926	5	3,3585	5,732	2,22	3,04
	Innerhalb der Gruppen	243,6394	430	0,5666			
	Total	260,4320	435				

also, daß zwischen Geschwisterpflanzen, die sich in einem einzelnen Gen unterscheiden, gesicherte Unterschiede in der Häufigkeit der Endchiasmen auftreten, die in mehreren Vergleichsgruppen immer in derselben Richtung nachweisbar sind.

#### D. Diskussion.

Die Zusammenfassung der an den verschiedenen Komplexkombinationen von *Oenothera* gewonnenen Ergebnisse über die Chiasmenhäufigkeit zeigte einige unerwartete Befunde. Nach den bisherigen Anschauungen über die Chiasmenbildung sollte die Endbindungshäufigkeit in gleichzeitig fixierten Proben nur kleinere Differenzen aufweisen, es fanden sich aber sowohl innerhalb einer Pflanze wie zwischen verschiedenen Individuen Schwankungen, die weit über das Maß des Zufälligen hinausgehen.

Zwischen den Teilen einer einzigen Anthere sind in nicht sehr seltenen Fällen gesicherte Differenzen der Endbindungshäufigkeit nachzuweisen. Erst bei der Betrachtung des Gesamtmaterials zeigt sich aber, daß diese Präparate nicht vereinzelte Ausnahmen sind, sondern nur die Extreme der normalen Variabilität darstellen. Die Unterschiede zwischen Teilen einer Anthere sind also nicht ausschließlich zufallsbedingt. Die Befunde an den Bastarden von *Oe. Hookeri* mit *Oe. franciscana* und *Oe. Johannsen* erlaubten sogar die Vermutung, daß eine solche Inhomogenität wahrscheinlich den Normalfall darstellt, nur ist sie meist so gering, daß die dadurch hervorgerufenen Unterschiede sich dem statistischen Nachweis entziehen. Für den Vergleich zwischen Antheren einer Knospe und zwischen Knospen einer Pflanze gilt ebenfalls, daß die Differenzen meist gering sind, aber doch bereits unter den wenigen Vergleichsgruppen, die sich aufstellen ließen, größere Unterschiede auftraten, als zufällig zu erwarten sind, besonders nach der Einwirkung extremer Bedingungen. Die bisher getroffene Annahme, daß zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Pflanze die Bedingungen für die Chiasmenbildung für alle Gruppen von reduzierenden Zellen gleichartig sind, trifft also sicher nicht uneingeschränkt zu.

Das zweite unerwartete Ergebnis war, daß zwischen gleichzeitig fixierten Pflanzen, die unter gleichen Umweltbedingungen gestanden hatten, doch regelmäßig erhebliche Differenzen der Chiasmenhäufigkeit gefunden wurde. Diese Inhomogenität kommt nicht dadurch zustande, daß nur ein Wert aus der Reihe herausfällt, sondern alle Einzeldaten liegen so weit auseinander, daß sie nicht als zufällige Abweichungen von einem gemeinsamen Mittelwert aufgefaßt werden können. Die Ursachen hierfür sind nicht einfach zu finden. Im Versuchsgelände standen die Pflanzen einer Sorte auf einem Beet ohne Bodendifferenzen dicht benachbart und waren fortlaufend numeriert. Der Entwicklungszustand

war äußerlich sehr gleichmäßig. Die Fixierungen im Freiland erfolgten vormittags schnell hintereinander. Ein Außeneinfluß, der sich mit fortschreitender Fixierungszeit änderte, etwa Temperatur oder Luftfeuchtigkeit, mußte sich in einer gesetzmäßigen Änderung der Endbindungswerte parallel zu der Standnummer (= Fixierungsfolge) der Pflanzen anzeigen; eine solche liegt aber eindeutig nicht vor. Bei *Oe. <sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri* standen z. B. die Pflanzen Nr. 15—17 direkt nebeneinander, Pflanze Nr. 24 durch 2 Pflanzenreihen mit je etwa 20 cm Abstand davon getrennt, also etwa 60 cm weiter weg. Es ist kaum anzunehmen, daß die geringen Temperaturdifferenzen, wie sie zwischen dicht benachbarten Stellen eines Beetes vorkommen, für die Unterschiede zwischen den Pflanzen verantwortlich sind, dagegen ist es wahrscheinlich, daß etwa den individuellen Unterschieden in der Bewurzelung der Pflanzen und der dadurch mitbedingten verschiedenartigen Wasser- und Mineralsalzversorgung für die Variabilität der Freilandwerte eine gewisse Bedeutung zukommt.

Alle Differenzen sind hierdurch jedoch nicht erklärlich. Es muß noch ein endogener Faktor mitwirken, der bei den einzelnen Pflanzen verschieden stark ist, aber die Richtung und die relative Größe der Abweichung vom Mittelwert des betreffenden Versuchstages bestimmt. Die Differenzen zwischen den Pflanzen zeigten sich überraschenderweise noch in einem weiteren Punkt, indem die einzelnen Individuen sehr verschiedenartig auf eine Veränderung der Außenbedingungen reagierten. Nach der Kältekammerbehandlung war gegenüber den Freilandwerten sowohl eine Erhöhung wie eine Erniedrigung der Endbindungszahl möglich, die Reihenfolge der Pflanzen im Niveau der Endchiasmenwerte blieb dabei aber gewahrt. Die Unterschiede sind demnach nicht durch besondere Bedingungen eines bestimmten Fixierungstages bestimmt, sondern von der Art, daß sie über längere Zeit hinweg in einer Pflanze gleichartig wirken und auch nach dem Abschneiden der Infloreszenz wenigstens für einige Zeit erhalten bleiben. Ihr Einfluß erstreckt sich nicht nur auf die absolute Höhe der Chiasmenfrequenz, sondern auch auf das Ausmaß ihrer Veränderlichkeit und die Richtung der Reaktion.

Um etwa doch eine Erklärung für die großen Differenzen zwischen aufeinanderfolgenden Fixierungstagen (6. und 7. 7. bei *Oe. <sup>h</sup>franciscana · <sup>h</sup>Hookeri*) zu finden, wurde ein Vergleich mit den Klimadaten dieser Tage durchgeführt<sup>1</sup>. Da die Chiasmenbildung längere Zeit vor der Fixierung bereits vollzogen ist, ist ein Zusammenhang mit den Klimadaten der Fixierungsstunden nicht zu erwarten, sondern eher eine Nachwirkung des vorhergehenden Tages. Der 5. und 6. 7. 47

<sup>1</sup> Für die Überlassung eines Auszuges aus der Klimatabelle für Juli 1947 (4.—7. 7.) bin ich Herrn Prof. Dr. LOSSNITZER, Deutscher Wetterdienst, Wetteramt Freiburg i. Br., zu Dank verpflichtet.

unterschieden sich nur wenig in der Temperatur und Bewölkung, dagegen deutlich in der relativen Feuchte, bedingt durch einen geringen Niederschlag in der Nacht zwischen beiden Tagen (2,1 mm). Die Fixierungen dieser Tage unterscheiden sich nicht nur in den Mittelwerten, sondern auch in der Streuung innerhalb und zwischen den Pflanzen (Tabelle 5). Der mangelnde Zusammenhang zwischen den Differenzen und den Klimadaten beweist noch zusätzlich die Richtigkeit der aus den Berechnungen gezogenen Schlußfolgerung, daß die Ergebnisse durch die Zufallsschwankungen zwischen den Pflanzen zu erklären sind.

Untersuchungen über die Variabilität der Chiasmenhäufigkeit in verschiedenen Teilen eines Individuums und zwischen Individuen wurden bisher nur in wenigen Fällen durchgeführt. Ein Vergleich der einzelnen Befunde mit den Verhältnissen bei *Oenothera* läßt aber bereits erkennen, welche allgemeinen Gesetzmäßigkeiten dabei zutage treten. Es handelt sich um Untersuchungen von *Poa* (GRUN 1952), Roggen (PRAKKEN 1943) und Planarien (BORRÁGAN-PASTOR und CALLAN 1952). GRUN untersuchte *Poa*-Arten und Bastarde und fand, daß sich kurze und lange Sprosse einer Pflanze nicht in der Univalentzahl unterscheiden. Große Unterschiede in der Chiasmenhäufigkeit müßten sich in einer Vermehrung der Univalente anzeigen; kleinere Differenzen können allerdings mit dieser Methode, die durch die Kleinheit der betreffenden Chromosomen gefordert wurde, nicht erfaßt werden, da eine Vermehrung der Univalente erst bei sehr großen Differenzen in der Chiasmenhäufigkeit statistisch bedeutsam wird. Eine andere Beobachtung wurde an Planarien gemacht (BORRÁGAN-PASTOR und CALLAN 1952). Während einer kurzen Zeit können am selben Tier Oozyten und Spermatozyten mit Meiosisstadien gefunden werden, wobei beide Organe gesetzmäßige Differenzen der Chiasmenzahl aufweisen, die in den Oozyten etwa doppelt so hoch ist wie in den Spermatozyten desselben Tieres. Dies ist durchaus im Sinne von OEHLKERS als eine Folge der verschiedenartigen Ernährungsverhältnisse beider Zellsorten zu interpretieren. Daß größere Differenzen zwischen verschiedenen, gleichartig behandelten Proben auch bei Versuchsmaterial von *Campanula* und *Rhoeo* vorkommen, ist aus den Tabellen von STRAUB (1937) zu entnehmen. Bei *Trifolium repens* (ATWOOD und HILL 1940) wurden dagegen keine Unterschiede zwischen den Pflanzen gefunden.

Da die Beobachtungen an *Oenothera* zeigten, daß die intraindividuellen Differenzen erst an einem großen Material nachzuweisen sind, kann das Fehlen gesicherter Unterschiede bei einem anderen Objekt noch nicht als Beweis für eine Sonderstellung der *Oenothera*-bastarde gelten. Die Untersuchungen an Planarien, die dagegen sehr große Differenzen innerhalb eines Tieres aufzeigten, sind nicht ohne weiteres vergleich-

bar, da es sich im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Oenothera* um sehr verschiedenartige Gewebeteile handelt.

Im hier gegebenen Zusammenhang ist aber wichtiger, daß die Chiasmenhäufigkeit in beiden Geweben jedes Tieres in einer engen Korrelation steht, und zwischen den Tieren sichere Unterschiede auftreten. Es ist hier bei der Chiasmenbildung also ein Faktor wirksam, der diesen Vorgang im Tier reguliert und in gleicher Weise auf die verschiedenartigen Gewebe einwirkt. In Parallele dazu stehen auch die Beobachtungen von PRAKKEN (1943) an Roggen. Es gibt bei dieser Art eine genetisch bedingte Asynapsis. Bei Pflanzen dieser Konstitution erfolgt die Pachytänpaarung normal, führt dann aber durch weitgehenden Ausfall der Chiasmenbildung zu sehr hohen Univalentzahlen in den späteren Meiosisstadien. Es ließ sich feststellen, daß der Grad des Chiasmenausfalles auch unter gleichen Umweltbedingungen bei diesen Pflanzen sehr verschieden sein kann. Neben der genetisch bedingten Differenz zwischen den asynaptischen und den normalen Pflanzen treten noch individuelle Unterschiede innerhalb jeder Gruppe auf. Bei *Poa* ließen sich diese Differenzen noch näher analysieren. Im Gegensatz zur Einheitlichkeit innerhalb einer Pflanze verhielten sich die Pflanzen einer Art am gleichen Standort verschieden. Genetische Unterschiede zwischen den Individuen können hierfür nicht die Ursache sein, da es sich um Klone handelte. Auch Pflanzen desselben Klonen an verschiedenen Standorten zeigten erhebliche Unterschiede. An Sonnen- und Regentagen traten außerdem gesicherte Differenzen der Univalenthäufigkeit auf, wobei die Reaktion für Einzelpflanzen in verschiedener Richtung liegen kann. Dieser Befund steht in Parallele zu den Beobachtungen an *Oenothera*, die für die Kältekammerbehandlung einen je nach der Pflanze verschiedenen Ausschlag ergaben.

Da die Meiosis in Individuen der gleichen Art unter gleichen Umweltbedingungen wohl nur wenig in der Ablaufgeschwindigkeit unterschieden ist, kann angenommen werden, daß die Zellen, die zum Fixierungszeitpunkt sich im gleichen, schnell vorübergehenden, für die Chiasmenzählung günstigen Stadium der Meiosis befinden, auch das Stadium der Chiasmenbildung fast gleichzeitig durchlaufen haben und dabei unter den gleichen Außenbedingungen gestanden haben. Wenn trotzdem bei verschiedenen Objekten gefunden wurde, daß sich die Individuen im Niveau der Chiasmenhäufigkeit unterscheiden, und die inter-individuelle Variabilität gesichert größer ist als die intra-individuelle, so beweist dies, daß neben den Umwelteinflüssen noch andere Faktoren mitwirken, die individuell verschieden sind, aber innerhalb des Individuums gleichartig arbeiten. Diese Faktoren sind nicht genetisch bedingt, wie die Untersuchungen an Klonen bei *Poa* zeigten. Die Versuche erwiesen auch, daß sie sich nicht sehr schnell ändern können,

da ihre Wirkung an *Oenothera* bei Fixierungen, die 10 Tage auseinanderliegen, in gleicher Weise feststellbar ist.

Die Beobachtung, daß die Univalentenzahlen bei *Poa* eine deutliche negative Korrelation zur Größe der Pflanzen aufweisen, legt es nahe, den von GRÜN für sein Material gezogenen Schluß auf die anderen Objekte zu übertragen und anzunehmen, daß sich die Vitalität der Individuen und kleinere Unterschiede in ihrem physiologischen Zustand bei der Chiasmenbildung auswirken. Die Untersuchungen an *Poa*, *Oenothera* und Planarien zeigen außerdem, daß dieser individuelle Faktor sich nicht nur auf die Höhe der Chiasmenbildung zu einem bestimmten Zeitpunkt auswirkt, sondern einmal ganz allgemein die Richtung und die relative Größe der Abweichungen vom durchschnittlichen Wert unter den betreffenden Bedingungen bestimmt und auch für die Art der Reaktion des Individuums auf Außenbedingungen von Bedeutung ist, da einzelne Pflanzen sehr verschieden auf einen Wechsel der Außenbedingungen reagieren können, und daß diese Reaktion in Zusammenhang mit der individuell verschiedenen Ausgangslage der Chiasmenhäufigkeit zu bringen ist.

Bei den Versuchen von MARQUARDT (1952) an *Oe. Hookeri* unter Freiland- und Kältekammerbedingungen wurden die Differenzen zwischen den Auszählungen von Versuchsmaterial aus verschiedenen Jahren auf Unterschiede in den Umweltbedingungen vor dem Versuch zurückgeführt und auch auf eine verschiedenartige Reaktion von Topfpflanzen und abgeschnittenen Infloreszenzen geschlossen. Durch den Vergleich mit dem hier vorliegenden Material ist auch eine andere Deutung möglich. Die Differenzen liegen etwa in der gleichen Größenordnung wie sie hier für Unterschiede zwischen Pflanzen gefunden wurden. Die Schlußfolgerung, daß die Differenzen zwischen den Knospen eines Versuchs nicht die Ursache für die Variabilität sein können, ist daher nicht unbedingt zwingend, sondern diese können durchaus als Erklärung für die Beobachtungen angenommen werden. Die verschieden großen Ausschläge der Reaktion in verschiedenen Jahren und bei Infloreszenzen und Topfpflanzen sind nicht auffallender als der Unterschied zwischen gleichzeitig behandelten, aber getrennt ausgezählten Pflanzen.

Die Befunde von MARQUARDT (1948) über Unterschiede in der Chiasmenhäufigkeit zwischen Pflanzen von *Oe. Hookeri* stellen dagegen eine Parallele dar zu den Befunden über Differenzen der Chiasmenhäufigkeit zwischen genetisch verschiedenen Individuen. Die von ihm untersuchten Pflanzen unterschieden sich durch reziproke Translokationen, also in der chromosomalen Konstitution, und können daher nicht in Beziehung zu der individuellen Variabilität genetisch gleichartiger Pflanzen gestellt werden.



Der Nachweis einer Differenz in der Chiasmenbildung zwischen den pollenfertilen und den pollensterilen Pflanzen aus der Nachkommenschaft von *Oe. flavens stringens* stellt eine interessante Ergänzung zu den Befunden von OEHLKERS (1927) und HARTE und BISSINGER (1952) über die Entwicklung der Pollensterilität dieser Formen dar. Dort wurde festgestellt, daß Unterschiede in der Antherenentwicklung der beiden genetisch verschiedenen Formen  $+^{fr}/+^{fr}$  und  $+^{fr}/fr$  (pollenfertil) einerseits,  $fr/fr$  (pollensteril) andererseits zuerst nach der Meiosis während der Pollenentwicklung deutlich werden. Hier zeigt sich an der Chiasmenbildung, daß bereits in frühen Entwicklungsstadien der Antheren, wenn anatomisch an den PMZ und Tapetengeweiben noch keinerlei Differenzen gegenüber der Normalentwicklung zu sehen sind, doch bereits physiologische Unterschiede vorhanden sein müssen, die sich an den PMZ durch eine stärkere Chiasmenbildung der Pollensterilen anzeigen. Die physiologische Differenz in der Tapetensekretion zwischen Normalen und Pollensterilen tritt also bereits in den ersten Stadien der Entwicklung auf. Sie ist zunächst gering und zeigt sich nur in der verschiedenartigen Reaktion der PMZ an und wird erst in späteren Entwicklungsstadien so groß, daß die Fehlentwicklung die Folge davon ist.

#### Zusammenfassung.

1. An 5 verschiedenen Bastarden von *Oenothera*-Arten wurde die Häufigkeit der Endchiasmen in den PMZ ausgezählt.
2. Die Mittelwerte der Antherenhälften stimmen meist überein, innerhalb einer Anthere können jedoch gesicherte Differenzen der Häufigkeit der Endchiasmen zwischen Gruppen von PMZ auftreten.
3. Zwischen Antheren einer Knospe und zwischen Knospen einer Pflanze sind ebenfalls Unterschiede in der Chiasmenhäufigkeit möglich.
4. Gleichzeitig fixierte Pflanzen gleicher genetischer Konstitution weisen fast immer gesicherte Unterschiede auf.
5. Die genetische Konstitution der Pflanzen in bezug auf die Allele  $fr$  und  $+^{fr}$  wirkt auf die Chiasmenhäufigkeit ein, wahrscheinlich über die Ernährung der PMZ durch die Tapetumsekrete.
6. Da von der Häufigkeit der Endchiasmen aus ein Rückschluß auf die Bedingungen für die Chiasmenbildung möglich ist, ergeben sich aus den Auszählungen Hinweise auf die Faktoren, von denen dieser Vorgang gesteuert wird.
7. Die Chiasmenbildung wird beeinflusst von einem Faktor, der in den reduzierenden Geweben einer Pflanze differieren kann, für kleinere Gruppen von PMZ aber einheitlich ist.
8. Ein weiterer Einfluß geht aus von der Vitalität und dem physiologischen Zustand der ganzen Pflanze und wirkt auf alle reduzierenden Gewebe des Individuums gleichartig.

9. Der individuelle Faktor überlagert die Gewebedifferenzen und äußert sich nicht nur in der Chiasmenfrequenz zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern auch in der Größe und Richtung ihrer Veränderung unter dem Einfluß veränderter Außenbedingungen.

10. Für die größeren Differenzen sind Umweltfaktoren von Bedeutung.

11. Die Tagesdifferenzen ließen sich nicht in Beziehung zu Klimadaten bringen. Sie sind bei den Freilandpflanzen nicht größer als aus der zufälligen Kombination stark variierender Einzelpflanzen erwartet werden muß.

12. Bei Untersuchungen über die Wirkung von Versuchsbedingungen auf die Chiasmenbildung darf daher erst dann auf eine Wirkung geschlossen werden, wenn die Differenz zwischen Versuch und Kontrolle größer ist als die Variabilität zwischen verschiedenen Pflanzen des Materials.

#### Literatur.

- ATWOOD, S. S., and H. D. HILL: The regularity of meiosis in microsporocytes of *Trifolium repens*. Amer. J. Bot. 27, 730—735 (1940). — BORRÁGAN-PASTOR, J., and H. G. CALLAN: Chiasma formation in spermatocytes and oocytes of the turbellarian *Dendrocoelum lacteum*. J. Genet. 50, 449—454 (1952). — FISHER, R. A., and F. YATES: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Edinburgh 1938. — GRUN, P.: Effect of environment upon chromosomal pairing of some species and hybrids of *Poa*. Amer. J. Bot. 39, 318—323 (1952). — HARTE, C.: Meiosis und crossing-over. Weitere Beiträge zur Zytogenetik von *Oenothera*. Z. Bot. 38, 65—137 (1942). — HARTE, C., u. B. BISSINGER: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchung der durch die Faktoren *fr* und *ster* bedingten Pollensterilität bei *Oenothera*. Z. Vererbungslehre 84, 251—269 (1952). — JAFHA, B.: Die Meiosis von *Oenothera*. II. Z. Bot. 34, 321—369 (1939). — LINNERT, G.: Die Bestimmung des Zeitpunktes für das Auftreten von Chromosomenmutationen in der Meiosis von *Oenothera* nach experimenteller Einwirkung. Z. Vererbungslehre 83, 414—421 (1951). — MARQUARDT, H.: Die Meiosis von *Oenothera*. I. Z. Zellforsch. 27, 159—210 (1937). — Das Verhalten röntgeninduzierter Viererringe mit großen interstitiellen Segmenten bei *Oenothera Hookeri*. Z. Vererbungslehre 82, 415—429 (1948). — Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch tiefe Temperatur. Z. Vererbungslehre 84, 169—181 (1952). — OEHLKERS, F.: Entwicklungsgeschichte der Pollensterilität einiger *Oenotheren*. Z. Vererbungslehre 43, 265—284 (1927). — Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. I. Z. Bot. 29, 1—52 (1935). — Meiosis und Crossing-over. Biol. Zbl. 60, 337—348 (1940). — POST, J. J.: Hand-leiding voor den opzet en de verwerking van Fisherproeven. 'S-Gravenhage: Algemeene Landsdrukkerij 1946 (deutsch: Springer 1952). — PRAKKEN, R.: Studies of asynapsis in rye. Hereditas 29, 475—495 (1943). — RENNER, O.: Die zytologischen Grundlagen des Crossing-over bei *Oenothera*. Z. Naturforsch. 3b, 187—196 (1948). — STRAUB, J.: Untersuchungen zur Physiologie der Meiosis. II. Z. Bot. 30, 1—57 (1936). — WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik. Jena: Gustav Fischer 1948.

Prof. Dr. CORNELIA HARTE, Institut für Entwicklungsphysiologie  
der Universität, Köln-Riehl, Amsterdamer Str. 36.

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Freiburg i. Br. und aus dem  
Forstbotanischen Institut der Universität Freiburg i. Br.

## UNTERSUCHUNGEN AN INTERPHASEKERNEN DES WURZEL- MERISTEMS VON VICIA FABA\*.

I. Mitteilung.

DESOXYRIBOSENUKLEINSÄURE-GEHALT UND GRÖSSE DER KERNE.

Von

E. GRUNDMANN und H. MARQUARDT.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. Juli 1953.)

### Einleitung.

Zytologische Untersuchungen an somatischen Kernen beschäftigen sich in erster Linie mit dem Studium der Chromosomen und der Chromosomenbewegungen. Analysen der Interphase, des Kernzustandes zwischen zwei Teilungen (LUNDEGÅRDH 1912), sind dabei etwas in den Hintergrund getreten, vor allem seit von der japanischen Schule (Zusammenfassung in KUWADA 1939) und speziell für den Interphasekern des pflanzlichen Pollens von MARQUARDT (1941) die grundsätzlichen Vorgänge der „Chromosomenauflockerung“ geklärt worden waren. Trotz dieser ungleichen Bewertung darf nicht vergessen werden, daß nach Abschluß einer Kern- und Zellteilung die zur Vorbereitung der folgenden Mitose dienenden Vorgänge im Zustand des Interphasekernes geschehen: Nach Abschluß der Anaphase besitzen die beiden Tochterkerne zwar die gleiche Anzahl der Chromosomen wie der Ausgangskern, jedoch nur die Hälfte der ursprünglichen Chromosomensubstanz. Da sich dieser Vorgang in der folgenden Mitose wiederholt, muß also zwischen Telophase und der nachfolgenden Metaphase eine Neubildung von Chromosomensubstanz vor sich gehen. Es wurde bisher als wahrscheinlich angenommen, daß dies im Laufe der Interphase, also zur Zeit der stärksten Auflockerung der Chromosomen geschieht. Durch morphologische Beobachtungen war jedoch gerade hier infolge dieses besonderen Chromosomenzustandes nichts Entscheidendes zu erkennen.

Einen neuen Ansatzpunkt zur Lösung der alten Frage nach dem Zeitpunkt der Neubildung von Chromosomensubstanz brachten erst zytochemische Untersuchungen und die Feststellung von BOIVIN und Mitarbeitern (1948), daß die Desoxyribosenukleinsäure (DNS) eine auffallend konstante Chromosomensubstanz darstellt. Neben die biochemischen Aufarbeitungsmethoden an einer umfangreichen Kernfraktion waren schon vorher die von CASPERSSON (1936) ausgearbeiteten

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Ultraviolett-Absorptionsmethoden getreten, die ebenfalls unsere Kenntnisse von der Zytochemie des Zellkerns wesentlich erweitert haben. Hierbei wurde das Absorptionsmaximum von Purin- und Pyrimidinbasen der Nukleinsäuren (2537 Å) benutzt. Durch fermentative oder hydrolytische Spaltung der DNS oder der Ribosenukleinsäure konnten diese beiden Nukleinsäuretypen auch getrennt gefaßt werden.

Vor dem Ausbau dieser Ultraviolett-Absorptionsmethode war aber von WIDSTRÖM (1928) und CASPERSSON (1932) ein anderer Weg vorbereitet worden, indem die mit Hilfe der Nuklealreaktion (FEULGEN und ROSSENBECK 1924) elektiv gefärbte DNS quantitativ bestimmt wurde. STOWELL (1942), POLLISTER und RIS (1947), LISON (1950) u. a. haben diesen Weg ausgebaut und mikrophotometrische Methoden angegeben, welche unter bestimmten Voraussetzungen eine verlässliche Messung des DNS-Gehaltes von Kernen und Kernteilen erlauben.

In der vorliegenden Arbeit haben wir zunächst auf der Basis der genannten Untersuchungen ebenfalls ein Gerät zur mikrophotometrischen Bestimmung der mit Feulgen gefärbten DNS entwickelt. Damit wurden dann die DNS-Werte in den Kernen der äußeren Periblemschichten in der rein meristematischen Zone der Wurzelspitze von *Vicia faba* bestimmt. Im Vordergrund standen dabei die Interphasekerne, es wurden aber ebenso die DNS-Werte in verschiedenen Stadien der Kernteilung gemessen. Gleichzeitig haben wir an allen Kernen das Volumen ermittelt, womit es uns möglich war, auch über die aktuelle Frage des Zusammenhangs von Kerngröße und DNS-Gehalt Aussagen zu machen.

#### Material und Methodik.

Wir verwandten als Objekt *Vicia faba*, FRANKS Hohenloher Ackerbohne, Population 4/10/5 (von Dr. FRANCK, Oberlimpurg bei Schwäbisch-Hall). Nachdem die Bohnen 72 Std in Petrischalen bei Zimmertemperatur gequollen waren, wurden sie in Sägespänen, die mit KNOPScher Nährlösung durchtränkt waren, kultiviert (BRAUER 1949). Als Kultorraum diente der Thermostatenraum des Freiburger Botanischen Institutes, eingestellt auf mittlere Luftfeuchtigkeit und eine Temperatur von 20° C. Nach 4 Tagen war eine genügend lange Hauptwurzel gewachsen, die in einer Länge von 0,3—0,5 cm gekappt und fixiert wurde. Nebenwurzeln wurden verworfen. Als Fixationsmittel diente das Bouin-Cleland-Gemisch (I: 600 cm<sup>3</sup> Pikrinsäure, 40 cm<sup>3</sup> Eisessig, 8 g Chromsäure; II: 200 cm<sup>3</sup> Formaldehyd 40% ig, 9 g Laktose; I:II = 3:1), in dem die Wurzelspitzen 24 Std blieben, um dann über eine in kleinen Schritten aufsteigende Alkoholreihe und über Benzol in Paraffin eingebettet zu werden. Die Schnittstärke betrug, um Kernanschnitte möglichst zu vermeiden, 25 µ. Gefärbt wurde nach FEULGEN, bzw. nach der von STOWELL (1945) angegebenen Modifikation mit einer Hydrolysedauer von 20 min bei 50° C in nHCl. Kontrollschnitte unterzogen wir dem gleichen Prozeß, nur ohne Hydrolyse.

Zu den DNS-Messungen verwendeten wir ein Absorptionsgerät, das in den wesentlichen Grundzügen dem von POLLISTER und RIS (1947) entsprach, wobei wir uns auf die Messung gefärbten Materials im monochromatischen, sichtbaren Licht beschränkt haben, also auf die Quarzoptik verzichten konnten.

Über ein arretiertes Mikroskop wurde ein 25 cm langes Rohr mit dem lichten Durchmesser des Okulars schwenkbar montiert und oben durch eine Irisblende abgeschlossen. Auf den Rand der Irisblende paßte, ebenfalls schwenkbar angebracht, ein Sekundärelektronenvervielfacher RCA 931 A, betrieben mit einem stabilisierten Netzgerät (Firma Dr. Georg Maurer, Neuffen-Wittg.). Der Anodenstrom des Vervielfachers wurde mit einem Lichtmarkengalvanometer HLM 3 der Firma Hartmann und Braun, Frankfurt a. M., das eine maximale Empfindlichkeit von  $4 \times 10^{-9}$  Amp. je Skalenteil aufwies, gemessen. Als Lichtquelle diente eine von einem Akkumulator gespeiste Niedervoltlampe von 4 Amp. Für die Messung der durch SCHIFFSches Reagens nach der Feulgen-Methodik angefärbten DNS wurde ein Interferenzfilter mit einem Durchlässigkeitsmaximum bei 544 m $\mu$  und einer Halbwertsbreite von 14 m $\mu$  schwenkbar unter dem Kondensator angebracht<sup>1</sup>.

Der Gang einer Messung war der folgende: In dem gefärbten Präparat wurde ein Zellkern in der Mitte einer direkt über der Irisblende aufgelegten Mattscheibe eingestellt und durch die Irisblende scharf eingekreist (Objektiv 100fach, Okular 5fach). Da die Kerne der äußeren Periblemlagen nahezu kugelig sind, war dies sehr gut möglich. Der den Kerndurchmesser als Eigendurchmesser besitzende Lichtkegel fiel nun in die Öffnung des Sekundärelektronenvervielfachers, der nach Entfernung der Mattscheibe so auf die Irisblende geschwenkt wurde, daß er dicht abschloß. Die Messungen erfolgten in einem verdunkelten Raum. Auf dem Galvanometer konnte jetzt die Lichtintensität ( $I_n$ ) als Anodenstromstärke abgelesen werden. Durch einen vorher in seinem Ausmaß geprobtten seitlichen Objekttransport auf dem Kreutzisch wurde nun die Wurzelspitze aus dem Beobachtungsfeld entfernt und der neue Anodenstrom, d. h. die Lichtintensität ( $I_n$ ) nach Durchtritt durch den zellfreien Raum, gemessen. Nach Entfernung des Sekundärelektronenvervielfachers konnte jetzt auf der erneut aufgelegten Mattscheibe kontrolliert werden, ob etwa noch gefärbtes Material im Lichtzylinder lag. Genau über der Irisblendenöffnung war ferner ein im Winkel von 45° geneigter Spiegel montiert, der nach Abnehmen der Mattscheibe das Licht rechtwinklig auf eine an der Wand ausgespannte weiße Fläche projizierte, auf der leicht mittels eines Stechzirkels der Durchmesser des Lichtzylinders bestimmt werden konnte. Da für die Berechnung lediglich relative Werte nötig sind, war der gewonnene Wert als solcher anwendbar. Auf die gleiche Weise wurde vor Messung der Lichtintensität ( $I_n$ ) der Durchmesser des Zellkernes bestimmt.

Die Berechnung fußte auf folgenden Grundlagen: Für die Substanzen, die dem LAMBERT-BEERESchen Gesetz entsprechen, ist die Extinktion ( $E$ ) proportional der Konzentration ( $c$ ), der Dicke ( $d$ ) des gemessenen Zylinders und einer Substanzkonstanten ( $k$ ):

$$E = c \cdot d \cdot k \quad (1)$$

d. h. die Extinktion ist eine lineare Funktion der Zahl der absorbierenden Moleküle. Die Gesamtmenge der absorbierenden Substanz ( $M$ ) in einem Zylinder ist ihrerseits abhängig von dessen Volumen ( $V$ ) und der Konzentration ( $c$ ) der Substanz:

$$M = V \cdot c. \quad (2)$$

Aus Formel (1) ergibt sich für die Konzentration

$$c = \frac{E}{d \cdot k}. \quad (3)$$

Das Volumen ( $V$ ) des Zylinders ist aber

$$V = r^2 \pi \cdot d. \quad (4)$$

<sup>1</sup> Wir danken Herrn Prof. Dr. W. MAIER und Herrn Dipl.-Phys. G. BAUMGARTNER vom Physikalischen Institut der Univ. Freiburg i. Br. für wertvolle Unterstützung.

Setzt man in Formel (2) die in (3) und (4) erhaltenen Symbole ein, so ergibt sich

$$M = r^2 \pi \cdot d \cdot \frac{E}{d \cdot k} = r^2 \pi \cdot \frac{E}{k}. \quad (5)$$

Da unsere Messungen nur Vergleichswerte von der gleichen Substanz liefern sollen, fallen  $\pi$  und  $k$  aus der Formel weg, und es resultiert

$$M' = r^2 \cdot E. \quad (6)$$

Die Extinktion ( $E$ ) wird angegeben als der Logarithmus von der reziproken Transmission ( $T$ ), dem Quotienten aus Lichtintensität ( $I_n$ ) nach Durchgang durch das Objekt dividiert durch die Lichtintensität ( $I_o$ ) ohne Objekt:

$$T = \frac{I_n}{I_o}. \quad (7)$$

Aus dem Gesagten ergibt sich für

$$E = \log \frac{I_o}{I_n}. \quad (8)$$

Setzt man Formel (8) in Formel (6) ein, so folgt

$$M' = \log \frac{I_o}{I_n} \cdot r^2. \quad (9)$$

d. h. die relative Gesamtmenge der absorbierenden Moleküle ist bestimmt durch den Logarithmus des Quotienten aus der Lichtintensität ohne Objekt dividiert durch Lichtintensität nach Durchgang durch das Objekt, der Logarithmus multipliziert mit dem Quadrat des Radius des gemessenen Lichtzylinders.

Als Beispiele sind in Tabelle 1 die Zwischendaten der Berechnung von 5 Kernen dargestellt. In der gleichen Tabelle ist zugleich die Kerngröße eingetragen ( $rK$  = Kernradius,  $VK$  = Kernvolumen).

Tabelle 1. Die Einzelwerte von 5 Messungen des DNS-Gehalts und der Kerngröße (Buchstabenerklärung im Text). Auszug aus der Tabelle der Meßergebnisse von K 29.

Nr.	$r$ mm	$r^2$	$rK$ mm	$rK$ $\mu$	$VK$ $\mu^3$	$I_n$	$I_o$	$E$	$M'$
21	10,5	111	9	5,6	737	23,5	42,5	0,257	28,4
22	10	100	8	5	523	26	40	0,187	18,7
23	10,5	111	8,5	5,3	619	24	39,5	0,216	24,0
24	10,5	111	9,5	5,9	867	25	45	0,255	28,3
25	9	81	7	4,4	356	21,5	33,5	0,193	15,7

### Analytischer Teil.

#### I. DNS-Messungen.

##### Die Voraussetzungen.

Die Exaktheit der DNS-Messungen mit der angegebenen Methodik ist von mehreren Voraussetzungen abhängig.

1. Die angewandte Färbung muß die zu messende Substanz quantitativ spezifisch anfärben. Aus der sehr umfangreichen Literatur, die über Grundlagen und Spezifität der Feulgen-Methode vorliegt (vgl. z. B. STOWELL 1946, MILOVIDOV 1947), und die im ganzen weit über 1000 Veröffentlichungen umfaßt, ist trotz mancher Gegenargumente zu entnehmen, daß mit dieser Färbung die DNS spezifisch gefärbt wird. Weiterhin darf nach den z. B. von RIS und MIRSKY (1949) und von LEUCHTENBERGER und Mitarbeiter (1951) durchgeführten Vergleichen



zwischen Absorptionsmethode nach Feulgen-Färbung und chemischer Analyse nach Organaufarbeitung als gesichert angesehen werden, daß die Färbung nach den Gesetzen der Stöchiometrie erfolgt. Die Auffassung von CHAYEN und Mitarbeitern (1953), die DNS diffundiere erst als Fixationsfolge vom Zytoplasma in den Kern, beruht auf einer falschen Interpretation von Vitalbeobachtungen, wie sich aus eigenen, noch unveröffentlichten Untersuchungen ergibt.

2. Das LAMBERT-BEERSche Gesetz (Formel 1) gilt für Substanzen, die einen bestimmten Raum im Mittel gleichmäßig ausfüllen. Da die Zellkerne bei der gewöhnlichen Fixations-Färbemethode große Unregelmäßigkeiten in ihrer Struktur besitzen, haben RIS und MIRSKY (1949) vorgeschlagen, isolierte Zellkerne mit Zuckerlösung zu behandeln. Die Zellkerne erscheinen dann nach Feulgenfärbung homogen-violett, ihre DNS ist also scheinbar gleichmäßig im Kernraum verteilt. Nun erbrachten eigene, noch unveröffentlichte Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop (GRUNDMANN und ALTMANN), daß durch Zuckerlösung lediglich eine Scheinhomogenität des Zellkerns entsteht. Die Chromosomen der Ruhekerns erfahren wohl eine starke zusätzliche Hydratation, verharren jedoch trotzdem noch in einem unterschiedlichen Kondensationsgrad. Das erstrebte Ziel, eine gleichmäßige Verteilung der DNS-Moleküle im Zellkern, ist auf diese Weise also nicht erreichbar. Da sich außerdem die in Zuckerlösung aufgequollenen Zellkerne morphologisch nicht beurteilen lassen, haben wir auf diese Variation der Methodik verzichtet, um so mehr als POLLISTER und SWIFT (1950) an Leberzellkernen von *Ambystoma maculatum* eine Proportionalität zwischen Schnittdicke und Extinktion gefunden und damit die praktische Brauchbarkeit der Fixationsfärbepreparate für die Absorptionsmethodik bewiesen haben.



Abb. 1 a u. b. Skizze zur Bedeutung der unregelmäßigen DNS-Verteilung im Zellkern für Ausschnittmessungen (s. Text).

3. In dem Bestreben, den Lichtkegel möglichst auf einen gleichmäßig mit absorbierender Substanz ausgefüllten Raum zu beschränken, wurde meist ein zylindrischer Ausschnitt aus dem Kern gemessen, von ALFERT (1950) z. B. ein solcher mit einem Durchmesser von 60% des größten Kerndurchmessers. Die Gesamt-DNS-Menge eines Zellkernes war aus dem Verhältnis zwischen absorbierendem Volumen und Gesamtvolumen leicht zu errechnen. An unseren Pflanzenzellen mußte diese Methodik mit erheblicher Fehlerbreite behaftet sein. Wie sich aus der Skizze in Abb. 1 ergibt, ist wegen der unregelmäßigen Verteilung der DNS-tragenden Kernelemente, die etwa in der frühen Prophase an der Kernmembran oder direkt am Nukleolus angehäuft erscheinen (Abb. 1a), und wegen der Nukleolen, die oft ein Drittel bis die Hälfte der Kernfläche einnehmen (Abb. 1b), die Wahrscheinlichkeit sehr gering, daß gerade ein Zylinder getroffen wird, der eine durchschnittliche Menge von Chromosomensubstanz enthält. Diese Wahrscheinlichkeit, einen solchen Zylinder zu treffen, muß mit dessen Durchmesser steigen, weswegen wir grundsätzlich das gesamte Kernvolumen absorbieren ließen.

Damit wurde aber eine weitere Fehlerquelle zugelassen, indem stets ein großer, außerhalb des Kernes gelegener, nichtgefärbter und somit nicht absorbierender Raum von den Lichtquellen passiert wird, die Inhomogenität im ganzen also zugenommen hat. Nun zeigt die folgende Überlegung jedoch, daß der nicht-absorbierende Raum auch bei Messung nur eines Ausschnittszylinders recht erheblich ist. Selbst bei homogenen Kernen ist nämlich der Idealfall (Abb. 2a), daß die

Schnittdicke genau dem Kerndurchmesser entspricht, nur sehr selten gegeben. Meist wird wie in Abb. 2b über und unter dem Kern ein nichtgefärbter Raum vorhanden sein, insbesondere da die Kernvolumina verschieden sind und die Schnittdicke sich nach dem größten Kerndurchmesser richten muß, wenn nicht wie in Abb. 2c nur ein Horizontalsektor gemessen werden soll, der keine genaue Errechnung des Gesamtgehaltes erlaubt. Oft sind, wie etwa bei unserer Fragestellung, die DNS-Werte der größten Kerne gerade besonders wichtig, dürfen also keinesfalls bei der Messung ausgelassen werden. Die in Rede stehende Fehler-

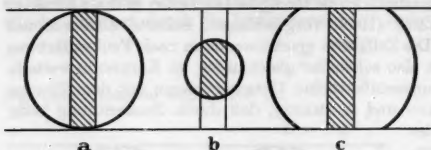


Abb. 2a—c. Skizze zur Abhängigkeit des DNS-freien Raumes im durchleuchteten Zylinder von der Kerngröße (s. Text).

sprechenden, sondern einen etwas größeren Zylinder mißt, so nehmen die Werte zunächst nur unwesentlich ab, und erst bei wesentlich größerer Öffnung der Irisblende treten ins Gewicht fallende Unterschiede auf (vgl. auch RIS und MIRSKY 1949). Über die Methode von PATAU (1952), der Absorption bei 2 Wellenlängen, haben wir noch keine Erfahrungen.

5. Die Absorptionswerte könnten durch Lichtbrechung und Lichtbeugung bei Durchtritt durch das Material beeinflußt werden. Dieser Fehlermöglichkeit wurde auf folgendem Wege nachgegangen: Es wurden Präparate gemessen, die in genau

Tabelle 2. Die mittels  $\chi^2$ -Test errechneten statistischen Übereinstimmungswahrscheinlichkeiten bei Vergleich der Messungsreihen von 4 Wurzelspitzen untereinander.

	K 21 I	K 21 II	K 26 II
K 29	0,78	0,25	0,45
K 26 II	0,60	0,02	
K 21 II	0,05		

der gleichen Weise wie die übrigen behandelt waren, bei denen jedoch die HCl-Hydrolyse ausgelassen war. Der Lichtverlust durch den ungefärbten Zellkern überschritt nicht 3% der bei gleicher Blendöffnung von einem hydrolysierten und damit färbbaren Präparat erhaltenen Extinktion, lag vielmehr im Durchschnitt um 1,5%. Damit konnte dieser Fehler, der bei allen Messungen gleichmäßig zu berücksichtigen wäre, vernachlässigt werden.

6. Aus den Untersuchungen von DI STEFANO (1948) und RIS und MIRSKY (1949)

geht hervor, wie stark der Extinktionswert, also die Färbungsintensität, von der Hydrolysedauer abhängt. Überhaupt können schon kleinste Differenzen im Färbegang die Meßwerte erheblich beeinflussen, weswegen STOWELL (1945) strenge Färbekriterien aufgestellt hat, die von uns durchweg befolgt wurden. Es ist anzustreben, die miteinander zu vergleichenden Objekte zusammen auf einem Objektträger zu färben. SWIFT (1950a) errechnete bei nacheinander gefärbten Geweben Extinktionsdifferenzen bis zu 15%. Nun stellten die unserer Untersuchung zugrunde liegenden Präparate zugleich die Kontrollen zu einer anderen Versuchsreihe dar. War es deshalb unmöglich, alle Präparate auf einem Objektträger zu vereinigen, so wurden zur Vermeidung dieses Fehlers alle Präparate mittels transportablen Färbebänkchen zugleich gefärbt. In Tabelle 2 sind von den Messungsgruppen der 4 Wurzelspitzen — jede auf einem anderen Objektträger —,

von denen insgesamt 300 Kerne gemessen und jede mit jeder mittels des  $\chi^2$ -Verfahrens in Beziehung gesetzt wurde, die statistischen Wahrscheinlichkeitswerte ( $P$ ) dafür gegeben, daß die zwischen 2 Messungsreihen aus je einer Wurzelapitze auftretenden Abweichungen zufallsbedingt sind. Nach allgemeiner Übereinkunft werden bei allen  $P$ -Werten über 0,01 die Abweichungen als zufallsbedingt angesehen und über 0,05 sogar als sicher zufallsbedingt. Da in unserem Material nur zufallsbedingte Abweichungen auftraten, darf das mit unserer Methodik gewonnene Zahlenmaterial als homogen angesehen werden.

### Die Ergebnisse.

Unter Berücksichtigung der genannten Bedingungen haben wir in den äußeren Zellschichten des Periblems, also in einem Bereich, der sicher außerhalb der Streckungszone blieb, DNS-Gehalt und Größe von 310 Zellkernen gemessen, und zwar von 20 Prophasen, 24 Telophasen und 266 Interphasen. Als Prophasen bezeichneten wir hierbei, um eine möglichst homogene Gruppe zu fassen, nur solche Kerne, die bei noch erhaltener Kernmembran deutlich die einzelnen Chromosomen erkennen ließen, als Telophasen nur die kompakt kondensierten Zustände.

Die vorprophasischen Kondensationsbilder, also die der Spiralprophase unmittelbar vorangehenden Stadien, wurden damit ebenso der Interphasegruppe zugeordnet, wie die schon deutliche Auflockerung der späten Telophase.

Für die Prophasen ergab sich ein Mittelwert von

$$M_P = 29,2 \pm 2,76$$

für die Telophasen

$$M_T = 14,3 \pm 1,89$$

$$M_P \approx 2 \times M_T$$

d. h. die Prophasekerne enthalten etwa die doppelte DNS-Menge wie die Telophasen.

In Abb. 3 sind die Fehlerkurven für die Prophasen- und Telophasenwerte aufgezeichnet. Man erkennt, daß beide Kerngruppen schon mit 10 Messungen einen mittleren Fehler aufweisen, der sich durch Erhöhung der Anzahl der Messungen nur noch wenig verringern läßt.

Die DNS-Werte der Interphasekerne sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Sie finden sich in allen durch die willkürlichen Einheiten der DNS-Werte

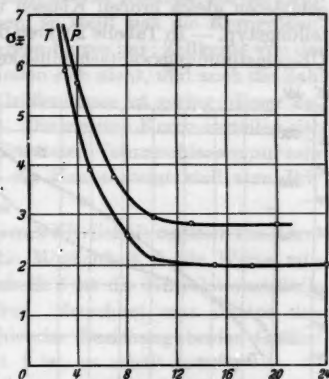


Abb. 3.  $\sigma_x$ -Test für Telophasen (T) und Prophasen (P) (s. Text).

Tabelle 3. Verteilung der Interphasekerne auf die DNS-Klassen (willkürliche Einheiten).

	DNS-Klassen								
	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Kernzahl . .	7	20	32	27	39	40	53	28	20

gebildeten gleich großen Klassen und bieten keinen statistischen Verteilungstyp. — In Tabelle 2 waren die mit Hilfe des  $\chi^2$ -Testes errechneten Übereinstimmungswahrscheinlichkeiten zwischen den Messungen an

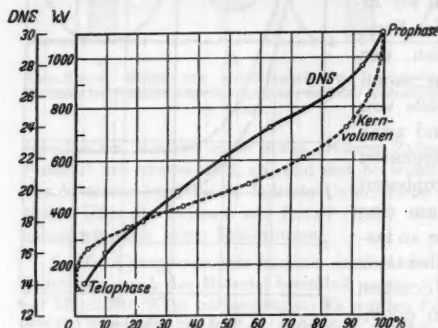


Abb. 4. Graphische Darstellung der Werte der Tabelle 3 und 4 in Prozent als Summenkurven (s. Text).

den einzelnen Wurzelspitzen aufgezeigt. Die daraus abzuleitende Folgerung, daß jede einzelne Messungsreihe eine dem Gesamtkollektiv entsprechende Verteilung aufweist, ermöglicht folgende Aussage: Die in Tabelle 3 dargestellte Klassenverteilung aller DNS-Werte darf als gültige Stichprobe der wahren Verteilung der DNS-Werte in den Interphasekernen angesehen werden. Es gibt also Interphasekerne mit

allen zwischen  $M_T$  und  $M_P$  liegenden DNS-Werten, ohne daß eine Klasse besonders bevorzugt würde. Das bedeutet aber bei dynamischer Betrachtung eine nahezu gleichmäßige Zunahme der DNS in der Interphase. Besonders sinnfällig wird dies, wenn man die Werte der Tabelle 3 als Summenkurve in ein Koordinatensystem einträgt, das als Abszisse die Anzahl der gemessenen Kerne in Prozent, in der Ordinate die DNS-Klassen besitzt (Abb. 4). Bei sehr intensiver DNS-Zunahme sofort nach Abschluß der Telophase fände sich die Mehrzahl der Kerne in den höchsten DNS-Klassen, die Kurve würde sofort steil ansteigen und dann ein Plateau bilden. Umgekehrt wäre eine nur die vorprophasischen Stadien betreffende DNS-Synthese an einem Überwiegen der niederen DNS-Werte kenntlich, bei Darstellung als Summenkurve im Koordinatensystem der Abb. 4 in einer zunächst der Abszisse nahezu parallel laufenden und kurz vor dem Ende steil ansteigenden Kurve. Beides ist nicht der Fall; die DNS-Synthese verläuft während der ganzen Interphase einschließlich der späten Telophase und der frühen Prophase nahezu linear.

## II. Kerngrößenmessungen und die Beziehungen zwischen beiden Meßgruppen.

Die Verteilung der 266 Interphasekerne auf 9 durch die Kernradien gebildeten Größenklassen ergibt sich aus Tabelle 4. Es liegt eine nach links verschobene, einer Normalkurve ähnelnde Verteilung vor. Trägt man analog den DNS-Werten die Anzahl der in den einzelnen Klassen gefundenen Kernvolumina in das Koordinatensystemen der Abb. 4 ein, wobei wieder die Anzahl der Zellkerne in Prozent auf der Abszisse, auf der Ordinate jedoch die Kerngrößen erscheinen, so stellt sich die Kerngrößenverteilung als eine S-förmig geschwungene Kurve dar: Zellkerne von der Größe der Telophasen (etwa  $100\mu^3$ ) finden sich nicht, und auch die Zahl der Kerne in der ersten gemessenen Größenklasse ist gering; dieser Zustand wird offenbar rasch durchlaufen. Die meisten Kerne verteilen sich in die 2.—7. Größengruppe, während die letzten Volumenklassen nur sehr kurze Durchgangsstadien darstellen; die Kurve steigt steil zum Prophasewert an.

Da für jeden einzelnen Kern mit dem DNS-Gehalt zugleich die Kerngröße gemessen wurde, ergab sich die Möglichkeit, beide Werte miteinander in Beziehung zu setzen. Tabelle 5 ist die Korrelationstabelle zwischen DNS-Gehalt und Kernradius. Errechnet man daraus den Korrelationskoeffizienten, der bei fehlender Beziehung beider Größen zueinander 0, bei (idealer) Gleichheit 1 ist, so erhält man

$$r = 0,78 \pm 0,06$$

Tabelle 4. Verteilung der Interphasekerne auf die Kerngrößenklassen.

	Kerngrößenklassen (Radius)								
	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5
Kernzahl . . . .	5	12	19	37	47	55	46	34	11

Tabelle 5. Korrelationstabelle der Beziehung zwischen Kerngröße und dem Gehalt der Kerne an Desoxyribonukleinsäure (DNS).

rK	DNS									
	14	16	18	20	22	24	26	28	30	
10,5	—	—	—	—	—	1	4	1	5	11
10	—	—	—	—	6	2	10	9	7	34
9,5	—	—	—	1	7	14	11	9	4	46
9	—	—	2	4	10	13	17	6	3	55
8,5	—	—	5	11	9	8	10	3	1	47
8	—	9	10	8	7	2	1	—	—	37
7,5	2	6	8	3	—	—	—	—	—	19
7	2	4	6	—	—	—	—	—	—	12
6,5	3	1	1	—	—	—	—	—	—	5
Summe	7	20	32	27	39	40	53	28	20	266

d. h. es besteht eine strenge Korrelation. (Dieser errechnete Korrelationskoeffizient liegt weit außerhalb des bei gleicher Anzahl der Messungen zu erwartenden Zufallshöchstwertes, ist also statistisch gesichert.) Damit ist festgestellt, daß während der Interphase Kerngröße und DNS-Gehalt in fester Beziehung zueinander stehen: Die Volumenzunahme des Zellkerns ist mit einer Vermehrung des DNS-Gehaltes gekoppelt und umgekehrt. Andererseits kann man damit aus dem DNS-Gehalt auf das Volumen des Zellkernes und — was sich als praktisch wichtiger erweist — vom Kernvolumen auf den DNS-Gehalt annäherungsweise schließen.

In diesem Zusammenhang war zu prüfen, ob die beiden in Abb. 4 dargestellten Kurven der DNS-Werte und der Kernvolumina etwa Stichproben ein und desselben Kollektivs sein können, oder ob sie signifikant voneinander differieren. Sie wurden deshalb mit Hilfe des  $\chi^2$ -Testes miteinander verglichen, wobei zunächst zu jedem DNS-Abszissenwert (Kernanzahl) der zugehörigen Abszissenwert der Kerngröße (ebenfalls die Kernanzahl) aufgesucht wurde, dann von beiden durch Subtraktion des jeweils voranstehenden Wertes die Differenz bestimmt und diese zueinander in Beziehung gesetzt wurden. Es fand sich mit

$$\frac{\chi^2}{m} = 4,38 \quad (3\sigma - \text{Äquivalent} = 3,64)$$

eine statistisch gesicherte Differenz zwischen beiden Kurven. Beide Verteilungen sind wohl zueinander korreliert, stellen jedoch Stichproben verschiedener Kollektive dar.

### Diskussion.

#### 1. Der DNS-Gehalt der Zellkerne.

Die vor allem seit 1947 vorgelegten quantitativen Bestimmungen des DNS-Gehaltes der Zellkerne haben zunächst in zwei Richtungen eine Klärung bewirkt: BOIVIN und Mitarbeiter (1948) konnten an Zellkernen aus mehreren, verschiedenartigen Organen des Rindes etwa die gleiche Menge an DNS nachweisen; sie fanden in ihnen den doppelten DNS-Gehalt als in den haploiden Spermakernen. In zahlreichen weiteren Publikationen konnte diese relative Konstanz der DNS-Werte in diploiden Kernen aus Zellen ein und desselben Individuums bestätigt werden (Zusammenfassung in DAVIDSON und LESLIE 1950).

Offensichtlich dürfen aber derartige Bestimmungen in rein biochemisch orientierten Arbeiten nicht zu schematisch gedeutet werden, denn auf der einen Seite konnte SWIFT (1950a und b) nachweisen, daß in einzelnen Tier- und Pflanzengeweben Kerne verschiedener Polyploidiestufe vorhanden sind mit entsprechender Vervielfachung des DNS-Wertes. Auf der anderen Seite haben SCHRADER und LEUCHTEN-



BERGER (1949) und LEUCHTENBERGER und SCHRADER (1951, 1952) sehr auffällige Schwankungen des DNS-Gehaltes in den Zellkernen einzelner Gewebe gefunden. In den Interphasekernen der Wurzelspitze von *Vicia faba* stellen wir ähnliche Schwankungen fest, dagegen relativ konstante Werte in den Prophasen und Metaphasen der Mitose. Wir können daher diesen DNS-Wert vor dem Eintritt der Anaphase, der bei *Vicia faba* von der Prophase an auftritt, als einen „Standardwert“ bezeichnen. Bei unserem Objekt findet sich somit in diesen morphologisch scharf charakterisierten Phasen der äußeren Periblemschichten in der rein meristematischen Zone der Wurzelspitze ein festgelegter Kern-DNS-Gehalt.

Als zweites Resultat folgte bereits aus den Arbeiten von CASPERSSON (1939) mit Hilfe der UV-Mikrophotometrie und dann von RIS (1947) mit Hilfe der auch von uns verwendeten Absorptionsmethode, daß der Standardwert der Metaphase durch die Anaphase recht genau in den Tochterkernen auf die Hälfte absinkt. Diese strenge Verteilungsweise auf die Tochterkerne gilt zunächst nur für die DNS. BRYAN (1951) fand dagegen bei der Pollenmitose eine Aufteilung des Eiweißgehaltes im Verhältnis 1:2 auf den generativen und vegetativen Kern.

Während somit alle vorliegenden Untersuchungen als Zeitpunkt einer Halbierung des DNS-Standardwertes die Anaphase ermittelten, liegen über den korrespondierenden Vorgang der Verdoppelung des halben Wertes zum Standard auffällig widersprechende Ergebnisse vor.

Eine Zunahme der DNS nur in der Prophase ist von CASPERSSON (1939) angegeben und von DARLINGTON (1947) für mannigfaltige zytologische Folgerungen übernommen worden. Zu dem gleichen Ergebnis kam RIS (1947) an Wurzelspitzenkernen der Zwiebel, wobei je Mitosephase allerdings nur je 5–10 Kerne gemessen wurden. Den gegenteiligen Befund — Beginn einer Verdoppelung des halben Standardwertes bereits im Verlauf der Anaphase — erhielten PASTEELS und LISON (1950) an Erythrozyten von Rattenembryonen, an Zellen der LIEBERKÜHNschen Krypten erwachsener Ratten und an Hühnerherzfibroblasten, ferner an den Kernen der Epidermis des Mäuseohres (BULLOUGH und PASTEELS 1951). Die in der Anaphase einsetzende Aufregulation schien dabei mit vollzogener Rekonstruktion des Zellkerns bereits beendet. In den Wurzelspitzen von *Zea mays* (SWIFT 1950b) lag der Beginn der DNS-Neubildung dagegen später, nämlich in der frühen Interphase. Nach den mit autoradiographischer Methodik erarbeiteten Befunden von PELC und HOWARD (1952) war bei dem auch von uns untersuchten Objekt *Vicia faba* die DNS-Verdoppelung etwa 6 Std vor Beginn der Prophase beendet. — Wieder andere Verhältnisse haben sich bei den Pollenmitosen von *Lilium* und *Tradescantia* ergeben: BRYAN (1951), OGUR und Mitarbeiter (1951) und PASTEELS und LISON (1951) wiesen nach, daß der Standardwert zwischen Meiosis und erster Pollenmitose erst durch einen starken Anstieg des DNS-Gehaltes kurz vor dem Einsatz der Pollenmitose erreicht wird. Autoradiographische Ergebnisse bestätigen dies (TAYLOR 1953).

Aus allen neueren Arbeiten folgt somit einheitlich, daß der Zeitpunkt der DNS-Vermehrung entweder in der Interphase liegt oder in den späten

Stadien der Kernteilung, der Anaphase oder Telophase. Der CASPERS-sonsche Befund einer DNS-Zunahme in der Prophase ist seitdem nicht wieder erhalten worden.

Unsere Ergebnisse an 266 Interphasekernen sind gegenüber den vorliegenden Befunden nochmals verschieden: Wir haben weder nach vollzogener Anaphase in den anschließenden Stadien noch unmittelbar vor Beginn der Prophase eine Intensivierung der DNS-Zunahme gefunden; es verteilt sich vielmehr die DNS-Verdoppelung gleichmäßig über die ganze Interphase.

Es ist naheliegend, die geschilderte Vielfalt hinsichtlich des Zeitraumes einer DNS-Verdoppelung zum Prophasewert einfach als Konsequenz einer Objektverschiedenheit zu interpretieren, wie sie sowohl zwischen pflanzlichen und tierischen Kernen verschiedener Arten bestehen kann. Die an demselben Objekt, bei *Vicia faba*, zwischen PELC und HOWARD (1951) und unseren Messungen erhaltene Differenz legt es aber nahe, zu prüfen, ob nicht darüber hinaus andere Ursachen für eine so auffällige Vielfalt der Ergebnisse gefunden werden können.

Zwischen den DNS-Bestimmungen der englischen Autoren und von uns bestehen bei identischem Objekt sowohl Verschiedenheiten in der Methode (Radiographie gegenüber Absorptionsmessungen) wie in der Auswahl gemessener Kerne. PELC und HOWARD bezogen auch Kerne aus der beginnenden Streckungszone ein, wo die Teilungsrate bereits herabgesetzt ist. Es muß daher damit gerechnet werden, daß an den Kernen dieser Zone bereits Differenzierungsprozesse beginnen und sie daher nicht ohne weiteres als echte Interphasekerne bezeichnet werden können. Da wir ausschließlich Periblemkerne in der mitosereichsten Zone gemessen haben, ist der zunächst allerdings wenig fundierte Gedanke naheliegend, daß die Differenz zwischen den Ergebnissen von PELC und HOWARD und uns mit einer verschiedenen Auswahl der Kerne zu erklären ist: Die vorzeitige Erreichung des Endwertes einige Zeit vor Beginn der Prophase kann in den Messungen der englischen Autoren durch Einbeziehung der Kerne aus der beginnenden Differenzierungszone zustande gekommen sein, um so mehr als die Abbildungen und die Diskussion der Befunde diese Zone betont berücksichtigen. Das würde bedeuten, daß bei diesen Kernen nach erfolgter Verdoppelung des DNS-Gehaltes der Eintritt der Prophase noch hinausgezögert wird.

Ein derartiger Interpretationsversuch wird nun durch andere, von uns abweichende Ergebnisse gestützt: Vor allem bei BRYAN (1951) wird bei der Darstellung der DNS-Verdoppelung in der Interphase des Pollenkerns von *Tradescantia* ausdrücklich darauf hingewiesen, daß in der Phase verlangsamter DNS-Zunahme umfangreiche Differenzierungsprozesse an der Pollenzelle vor sich gehen. Deutlicher noch als bei den

Periblemkerne in der beginnenden Differenzierungszone ergibt sich somit hier, daß Differenzierungsleistung und DNS-Synthese mindestens bis zu einem gewissen Grade sich gegenseitig ausschließen. Infolgedessen muß unmittelbar vor der Prophase in einem Stadium gesteigerter DNS-Bildung der noch bis zum Standardwert fehlende Betrag nachgeliefert werden.

Im Gegensatz zu den genannten pflanzlichen Zellen sind an Tieren bisher in erster Linie Organzellen untersucht worden, welche außer der Teilung noch bestimmte Funktionen zu erfüllen haben. Charakteristischerweise zeigen nun auch die Mäuseleber und die Salamandervorniere nach SWIFT (1950c) dasselbe Verhalten der DNS-Synthese wie die Pollenzellen von *Tradescantia*. Nach Rekonstruktion der Interphase wird der Zellkern in derartigen Geweben statt zu einer Differenzierungsleistung zu funktioneller Arbeit herangezogen, was aus bestimmten morphologischen Veränderungen am Zellkern geschlossen werden muß. Dementsprechend steigt der DNS-Gehalt nur zögernd an, so daß wir hier eine ähnliche Korrelation zwischen DNS-Synthese und Funktion finden; sie scheint ebenso wie eine Differenzierungsleistung den Anstieg der DNS zu verzögern oder mehr oder weniger ganz zu unterdrücken.

Während dabei Leber- und Vornierenzellen die zunächst ausgebliebene DNS-Neubildung unmittelbar vor der Mitose, d. h. nach Abschluß der aktuellen Funktion, nachholen, ist bei den Objekten von LISON und Mitarbeitern eine Erfüllung der funktionellen Aufgabe von Zelle und Zellkern offenbar nur nach erfolgter Verdoppelung der DNS möglich. Infolgedessen ist bei diesen ausdifferenzierten Gewebezellen die Verdoppelung mit der Rekonstruktion des Zellkernes praktisch bereits abgeschlossen.

Als Ergebnis einer Interpretation des bisher erarbeiteten experimentellen Materials haben wir somit die folgende Arbeitshypothese erhalten: Eine Differenzierungsleistung und die spezielle Erfüllung einer Organfunktion setzen in den Zellkernen die Geschwindigkeit der DNS-Synthese, meßbar in der Zunahme des DNS-Gehaltes, stark herab. In Kernen, von denen nur Wachstumsleistungen verlangt werden, wie etwa in der meristematischen Zone von *Vicia faba*, findet daher keine Hemmung der DNS-Synthese statt; wir beobachten über die ganze Interphase einen kontinuierlichen Anstieg der DNS-Werte. In der Streckungszone der Wurzelspitzen, in den Pollenzellen und bei den Zellen verschiedener tierischer Organe kommt es durch die zusätzliche Beanspruchung der Kerne — Differenzierung oder spezielle Funktion — zu einer diskontinuierlich verlaufenden DNS-Synthese. Entweder vor oder nach einer Erfüllung der zusätzlichen Aufgaben wird der zur Einleitung einer neuen Mitose notwendige DNS-Wert in einer Phase besonders intensiver Synthese erreicht.

## 2. DNS-Gehalt der Zellkerne und das Problem der Teilungsauslösung.

In allen neueren Arbeiten über den DNS-Gehalt der Zellkerne hat sich gezeigt, daß die Verdoppelung des in der Anaphase halbierten DNS-Wertes zum Standardwert der Prophase in der Interphase geschieht. Die äußeren Schichten des Periblems in der rein meristematischen Zone von *Vicia faba* besitzen darüber hinaus die Eigenschaft, daß bei kontinuierlichem Anstieg des DNS-Wertes mit der Erreichung des Standardwertes gleichzeitig die neue Mitose einsetzt, zwischen beiden Vorgängen somit eine enge zeitliche Korrelation besteht. Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, als die von uns verwendete Methode der Bestimmung relativer DNS-Werte mit mancherlei Unsicherheiten behaftet ist; es wäre daher zu erwarten gewesen, daß wir an Stelle eines Standardwertes mit nicht zu großer Streuung einen mehr oder weniger breiten „Standardbereich“ gefunden hätten, welcher die Feststellung dieser zeitlichen Korrelation sehr erschwert, wenn nicht unmöglich gemacht hätte. Wir glauben daher aus unseren zahlenmäßigen Ergebnissen schließen zu können, daß hier einer der entscheidenden Faktoren zur Teilungsauslösung die Erreichung des DNS-Standardwertes sein muß, da bei unserem Material zwischen diesem Zeitpunkt und dem Beginn der Prophase kein faßbares Intervall nachgewiesen werden kann. Dies gilt mindestens für den normalen physiologischen Zustand der meristematischen Zelle der Wurzelspitze. In Angriff genommene Experimente mit teilungshemmenden Agentien werden zu zeigen haben, ob in diesen Fällen die Hemmungswirkung auf einer Störung der DNS-Synthese beruht oder ob noch zusätzliche Faktoren hier nachgewiesen werden können.

Weiterhin folgt aus der beobachteten Koinzidenz einer Erreichung eines Standardwertes und dem Mitosebeginn, daß der zeitliche Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen im wesentlichen nur abhängig ist von der Geschwindigkeit der DNS-Verdoppelung während der Interphase, in unserer Darstellung der Abb. 4 also von dem Winkel der DNS-Zunahme.

In den Interphasen der von 3 verschiedenen Autoren mit 3 verschiedenen Methoden untersuchten Pollenzellen scheinen ähnliche Verhältnisse vorzuliegen: Nach zunächst langsamer DNS-Zunahme in der Interphase steigt kurz vor dem Teilungsbeginn der DNS-Gehalt rasch an, und nach Erreichung des für *Tradescantia* typischen Prophasewertes setzt ebenfalls die Kernteilung ein.

Im Gegensatz zu diesen bisher untersuchten Verhältnissen bei pflanzlichen Objekten stehen die Ergebnisse von PASTEELS und LISON (1950) an Zellen verschiedener tierischer Organe. Hier fehlt die entscheidende Koinzidenz zwischen Erreichung eines Standardwertes und Teilungsbeginn; es müssen daher andere Faktoren als die DNS-Synthese an der Teilungsauslösung maßgeblich beteiligt sein.

Es ergibt sich somit, daß für eine Teilungsauslösung bei verschiedenen Objekten verschiedene Faktoren ausschlaggebend sind. Relativ übersichtlich liegen die Verhältnisse bei den von uns untersuchten meristematischen Zellen und vielleicht auch beim Pollenkorn, komplexer dagegen bei Zellen, welche mit einer speziellen Organfunktion betraut sind. Weitere Untersuchungen sowohl an pflanzlichem wie tierischem Material werden zu zeigen haben, ob hier den pflanzlichen Zellen und unter ihnen den meristematischen die Sonderstellung zukommt, wie wir sie eben herausgearbeitet haben. Trotz dieses Fehlens breiteren Materials können wir aber auf Grund ihrer DNS-Verhältnisse die von uns untersuchten meristematischen Interphasekerne von *Vicia faba* folgendermaßen charakterisieren: *Ein meristematischer Interphasekern ist ausgezeichnet durch die Eigenschaft einer kontinuierlichen DNS-Neubildung bis zur Erreichung eines festgelegten, eine gewisse Streuung aufweisenden Prophase-Standard-Wertes. Die Erreichung dieses Prophase-Standard-Wertes stellt gleich den wesentlichen Faktor zur Auslösung der neuen Mitose dar; die Dauer der Interphase ist somit eine Funktion der Geschwindigkeit der DNS-Synthese.*

### 3. DNS-Bestimmung und das Problem der Längsspaltung.

Die Tatsache, daß nach Ablauf der Anaphase in den Tochterkernen eine Neubildung von Chromosomensubstanz stattfinden muß, um die nächste Mitose wieder zu ermöglichen, ist bisher allein unter morphologisch-strukturellen Gesichtspunkten gesehen worden: Es existiert eine außerordentlich umfangreiche und widerspruchsvolle Literatur über das Problem der Längsspaltung, d. h. es wurde alle Mühe darauf verwendet, den Zeitpunkt der Längsspaltung als Endzustand dieser Neubildung von Chromosomensubstanz festzustellen.

Noch in der Darstellung DARLINGTONS (1937) erscheint dieses Problem einfach. In der Mitose ist das Chromosom in die beiden Chromatiden gespalten; der einzige Längsspalt in ihm ist der „funktionelle“ Längsspalt, welcher in der Anaphase als der trennende Spalt zwischen den Tochterchromosomen wirksam wird. Das nach der Anaphase in den Tochterkernen als einheitliche Bildung ohne weiteren Spalt vorhandene Chromosom vollzieht erst in der Prophase der folgenden Mitose seine Längsspaltung.

Die Mehrzahl der Zytologen konnte jedoch schon vor DARLINGTON mehr als nur den funktionellen Längsspalt nachweisen; so ist das Metaphasechromosom bald als 4teilig, bald als 8teilig beschrieben worden (Zusammenfassungen in STRAUB 1938, KUWADA 1939, NEBEL 1939, KAUFMANN 1948). Es wurde dabei viel Mühe aufgewendet, um für diese morphologischen, funktionell erst mehrere Teilungsschritte später bedeutungsvollen Längsspalte den Zeitpunkt des ersten Auftretens

zu ermitteln. Eine einheitliche Auffassung konnte dabei natürlich nicht erzielt werden, denn außer von der Fixierungstechnik ist das erhaltene Bild, wie von MARQUARDT (1941) ausgeführt wurde, von dem Zustand des Chromosoms und seiner Dimension in den verschiedenen Phasen der Mitose abhängig: frühe Prophasen und Anaphasen erweisen sich dabei als besonders refraktär gegen eine Analyse des Längsspaltungszustandes. — Die vielfältigen Bemühungen, die Längsspaltung als morphologischen Ausdruck einer Verdoppelung der Chromosomensubstanz zu bestimmen, sind somit praktisch erfolglos geblieben.

Die DNS-Bestimmungen in der Interphase und in der Mitose erscheinen uns ein geeigneteres Verfahren zu sein, die Frage nach dem Zeitraum einer Vermehrung der Chromosomensubstanz zu klären. Es handelt sich ja dabei im Grunde zunächst gar nicht um ein strukturelles, sondern um ein biochemisches Problem, und ihm ist eine biochemische Methode, eben die Bestimmung der DNS, adäquater als strukturelle Analysen der Zahl vorhandener Längselemente je Chromosom.

Die vorliegenden Untersuchungen über den Zeitraum, in welchem die DNS-Verdoppelung geschieht, lassen dabei bereits erkennen, daß hier Verschiedenheiten möglich sind: Die meristematischen Kerne von *Vicia faba* benötigen die ganze Interphase dazu, in den im vorherigen Abschnitt diskutierten Fällen liegt der Zeitpunkt hauptsächlich der DNS-Neubildung entweder am Anfang oder am Ende des Zeitraumes zwischen zwei Teilungen.

So hat sich also ergeben, daß bereits die ersten biochemischen Feststellungen des DNS-Gehaltes der Zellkerne eine klare Antwort auf die alte Frage des Zeitpunktes der Chromosomensubstanzvermehrung gegeben haben, eine Antwort, welche mit Hilfe einer Analyse von Längsspaltungsverhältnissen trotz allen Bemühungen nicht gefunden worden ist. Es ist aber selbstverständlich, daß mit einem Einsatz der DNS-Bestimmungen für die Lösung dieses Problems erst der erste Schritt zu seiner Bearbeitung getan ist; es wird die Aufgabe der folgenden Arbeit sein, nach Kenntnis des Zeitraumes der DNS-Verdoppelung die Interphasekerne zytomorphologisch von neuem zu untersuchen mit dem Ziel, den morphologischen Ausdruck der DNS-Synthese im Zellkern zu erfassen.

#### 4. DNS-Bestimmung und Kerngröße.

Charakteristisch für einen Interphasekern zwischen Telophase und Prophase der neuen Mitose ist seine allmähliche Volumenzunahme auf den Ausgangswert für die nachfolgende Teilung. Diese Feststellung kann leicht durch Messung des Posttelophasewertes einerseits und des Präprophasewertes andererseits gewonnen werden.

Die meisten, vor allem von anatomischer Seite erhobenen Befunde über die Kerngröße sind aber nicht an sich teilenden, sondern an aus-



differenzierten Kernen bestimmter Organe gewonnen worden, indem eine größere Kernzahl vermessen und ausgewertet wurde (JACOB 1942). Die Verhältnisse erwiesen sich gerade dabei als besonders kompliziert, da meist verschiedene Polyploidiestufen mit einer entsprechenden, verschiedenen Kerngröße gefunden wurden. Sehen wir hier aber von dieser Komplikation ab, dann ergab sich für die Kerngröße ein und derselben Polyploidiestufe eine glockenförmige Kurve, wenn auf der Abszisse die Kerngröße und auf der Ordinate die Zahl der jeder Klasse zugehörigen Kerne aufgetragen wurde.

Die für eine Gaußkurve typische Abflachung statt einer scharfen Spitze brachte bei der Häufigkeit dieses Befundes SCHREIBER (1949) auf den Gedanken, daß dies nur zustande kommen könne, wenn im Bereich einer bestimmten Kerngröße ein Wachstumsstillstand eintritt, so daß bei den Messungen in diesen Größenklassen die höchste Anzahl von Kernen gefunden werden muß. Diese Phase verlangsamten Kernwachstums nannte SCHREIBER die „Sesquiphase“ und knüpfte daran die weitere Hypothese, daß in diesem besonderen Zustand die „Reduplikationsvorgänge“ ebenfalls verlangsamt oder aufgehoben seien.

Eine graphische Darstellung unserer Ergebnisse in derselben Weise zeigt zunächst (Abb. 5), daß in den meristematischen Kernen einfache Verhältnisse vorliegen, indem nur ein einziger Kurvengipfel vorhanden ist; irgendwelche Polyploidiestufen sind somit in dem von uns herangezogenen meristematischen Bereich, wie zu erwarten, nicht vorhanden. Darüber hinaus resultiert auch hier der Typ der Glockenkurve.

Gegenüber den meisten bisherigen Messungen der Kerngröße unterscheiden sich unsere Befunde durch die Tatsache, daß von jedem gemessenen Kern gleichzeitig eine DNS-Bestimmung vorliegt. Wir sind somit in der Lage, jeder Kerngrößenklasse einen bestimmten DNS-Wert zuzuordnen, und haben daher in Abb. 4 die Zunahme des DNS-Gehaltes und der Kerngröße kurvenmäßig zusammengefaßt. Der Verlauf der Kurve der Kerngröße zeigt dabei deutlich, daß nach einer anfänglichen posttelophasischen starken Volumzunahme ein größerer Zeitraum verlangsamer aber nicht ganz unterdrückter Volumzunahme folgt, um präprophasisch dann nochmals zur schnelleren Volumzunahme überzugehen. Soweit ist also der erste Teil der Interpretation SCHREIBERS auch bei unserem Material zutreffend. Der Vergleich dieser Kurve mit derjenigen der DNS-Zunahme zeigt aber, daß auch in der Phase

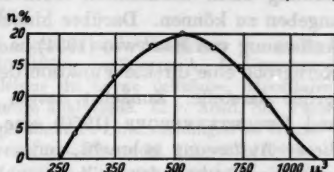


Abb. 5. Verteilungskurve der aus Tabelle 4 errechneten Kerngrößen der Interphasekerne

verlangsamter Volumenzunahme der DNS-Gehalt kontinuierlich ansteigt und so die Werte beider Bestimmungen an diesen Stellen statistisch verschieden werden. Verlangsamte Volumzunahme der Zellkerne bedeutet daher hier nicht gleichzeitig Sistierung der DNS-Neubildung; der zweite Teil der SCHREIBERSchen Hypothese steht somit in Widerspruch zu unseren experimentellen Bestimmungen.

Zwei allgemeine Folgerungen lassen sich aus unseren Ergebnissen ziehen: Zunächst sind wir in der Lage, für die von uns untersuchte Kernart bei Feststellung einer bestimmten Kerngröße den ungefähren DNS-Gehalt aus unseren Kurven abzulesen, und umgekehrt bei Feststellung eines bestimmten DNS-Gehaltes die ungefähre Kerngröße angeben zu können. Darüber hinaus können wir die Berechtigung der Auffassung von HERTWIG (1934) nachprüfen, nach welcher die jeweilige Kerngröße eine direkte Funktion der jeweiligen Chromosomenzahl und -größe darstelle. Zunächst hatten hier die Arbeiten von SCHRADER und LEUCHTENBERGER (1950) eine Einschränkung in der Gültigkeit dieser Auffassung gebracht, indem sich das Kernvolumen außerdem vom Eiweißgehalt des Zellkerns abhängig erwies. Unser Ergebnis der statistischen Differenz der DNS-Zunahme in der Interphase einerseits und der Volumenvermehrung andererseits darf ebenfalls als ein Hinweis dafür gelten, daß über die Kerngröße noch andere Faktoren als der DNS-Gehalt entscheiden. Es ist klar, daß allein auf Grund von DNS-Messungen und Bestimmungen der Kerngröße über diese Faktoren zunächst keine Aussagen gemacht werden können. In der folgenden Mitteilung wird daher zu zeigen sein, ob durch morphologische Untersuchungen an unseren Interphasekernen ein weiterer Einblick gelingt.

#### Zusammenfassung.

1. Nach in der Literatur vorliegenden Angaben wird ein Gerät zur Mikrophotometrie zytologischer Objekte konstruiert und unter Anwendung der Feulgen-Färbung ein Meßverfahren für relative DNS-Werte entwickelt.
2. In den äußeren Periblemschichten des Wurzelmeristems von *Vicia faba* werden von insgesamt 310 Zellkernen DNS-Gehalt und Volumen gemessen. Die Telophasen besitzen die Hälfte der DNS der Prophasen; die Anaphase halbiert die Kern-DNS.
3. Dieser Halbierung folgt eine die ganze Interphase beanspruchende, nahezu lineare Zunahme der DNS im Interphasekern.
4. Das Kernvolumen wird in der Interphase verelfacht. Sofort nach der Telophase und kurz vor der Prophase lassen sich Stadien besonders intensiver Volumenzunahme nachweisen.

5. In der Diskussion werden die bisher vorliegenden Ergebnisse anderer Autoren über den DNS-Gehalt des Zellkernes zusammengestellt und mit den eigenen Befunden in Beziehung gesetzt.

6. Die Besonderheit eines reinen Interphasekernes wird in der kontinuierlichen Zunahme des DNS-Gehaltes sowie in der unmittelbar nach Erreichen eines „Standardwertes“ eintretenden Kernteilung gesehen.

7. Abschließend werden die Probleme des Zusammenhangs von DNS-Zunahme und Längsspaltung einerseits sowie von DNS-Gehalt und Kerngröße andererseits erörtert.

### Literatur.

- ALFERT, M.: A cytochemical study of oogenesis and cleavage in the mouse. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **36**, 381—410 (1950). — BOIVIN, A., R. VENDRELY et C. VENDRELY: L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire, dépositaire des caractères héréditaires; arguments d'ordre analytique. *C. r. Acad. Sci. Paris* **226**, 1061—1063 (1948). — BRAUER, I.: Experimentelle Untersuchungen an Wurzelspitzen-Mitosen von *Vicia faba*. I. Normalverhalten. *Planta* **36**, 411—423 (1949). — BRYAN, J. H. D.: DNA-Protein relations during microsporogenesis of *Tradescantia*. *Chromosoma* **4**, 369—392 (1951). — BULLOUGH, W. S., and J. PASTEELS: Desoxyribosenucleic acid synthesis during cell division in mouse epidermis. *Nature* **168**, 608 (1951). — CASPERSSON, T.: Die quantitative Bestimmung von Thymonukleinsäure mittels fuchsin-schwefliger Säure. *Biochem. Z.* **253**, 97—111 (1932). — Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns. *Skand. Arch. Physiol.* **73**, Suppl. 8, 1—151 (1936). — Über die Rolle der Desoxyribosenukleinsäure bei der Zellteilung. *Chromosoma* **1**, 147—156 (1939). — CHAYEN, J., and K. P. NORRIS: Cytoplasmic localisation of nucleic acids in plant cells. *Nature* **171**, 472—473 (1953). — DARLINGTON, C. D.: Recent advances in cytology, 2. Aufl. London 1937. — Nucleic acid and the chromosomes. *Symposia Soc. f. Exper. Biol.* **1**, 252—269 (1947). — DAVIDSON, J. N., and I. LESLIE: Nucleic acids in relation to tissue growth: A review. *Cancer Res.* **10**, 587—594 (1950). — FEULGEN, R., u. H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thymo-Nukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. physiol. Chem.* **185**, 203—248 (1924). — HERTWIG, G.: Die Vielwertigkeit der Speicheldrüsenkerne und -chromosomen bei *Drosophila melanogaster*. *Z. Abstammungslehre* **70**, 496—501 (1934). — JACOB, W.: Die verschiedenen Arten des gesetzmäßigen Zellwachstums und ihre Beziehungen zu Zellfunktion, Umwelt, Krankheit, maligner Geschwulstbildung und innerem Bauplan. *Arch. Entw.mechan.* **141**, 584—692 (1942). — KAUFMANN, B. P.: Chromosome structure in relation to the chromosome cycle. *II. Bot. Review* **14**, 57—97 (1948). — KUWADA, Y.: Chromosome structure. A critical review. *Cytologia* **10**, 213—256 (1939). — LEUCHTENBERGER, C., and F. SCHRAEDER: Relationship between nuclear volumes, amount of intranuclear proteins and desoxyribosenucleic acid (DNA) in various rat cells. *Biol. Bull.* **101**, 95—98 (1951). — Variation in the amounts of desoxyribosenucleic acid (DNA) in cells of the same tissue and its correlation with secretory function. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **38**, 99—105 (1952). — LEUCHTENBERGER, C., R. VENDRELY and C. VENDRELY: A comparison of the content of desoxyribosenucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **37**, 33—38 (1951). —

LISON, L.: Étude et réalisation d'un photomètre à l'usage histologique. *Acta anat.* **10**, 333—347 (1950). — LUNDEG RD, H.: Fixierung, Färbung und Nomenklatur der Kernstrukturen. Ein Beitrag zur Theorie der cytologischen Methodik. *Arch. mikrosk. Anat.* **80**, 223—273 (1912). — MARQUARDT, H.: Untersuchungen über den Formwechsel der Chromosomen im generativen Kern des Pollens und Pollenschlauches von *Allium* und *Lilium*. *Planta* **31**, 670—725 (1941). — MILOVIDOV, P. F.: Physik und Chemie des Zellkerns. *Protoplasma-Monographien*, Bd. 20. Berlin: Gebr. Borntraeger 1949. — NEBEL, B. R.: Chromosome structure. *Bot. Rev.* **5**, 563—626 (1939). — OGUR, M., R. O. ERICKSON, G. U. ROSEN, K. B. SAX and C. HOLDEN: Nucleic acids in relation to cell division in *Lilium longifolium*. *Exper. Cell. Res.* **2**, 73—89 (1951). — PASTEELS, J., et L. LISON: Recherches histophotométriques sur la teneur en acide désoxyribosenucléique au cours de mitoses somatiques. *Arch. Biol. Liège* **61**, 445—474 (1950). — Étude quantitative de l'acide désoxyribonucleique au cours de la formation du pollen chez *Tradescantia virginiana*. *C. R. Acad. Sci. Paris* **233**, 196—197 (1951). — PATAU, K.: Absorption microphotometry of irregular shaped objects. *Chromosoma* **5**, 341—362 (1952). — PELC, S. R., and A. HOWARD: Chromosome metabolism as shown by autoradiographs. *Exper. Cell. Res.*, Suppl. **2**, 269—278 (1952). — POLLISTER, A. W., and H. RIS: Nucleoprotein determination in cytological preparations. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 147—157 (1947). — POLLISTER, A. W., and H. H. SWIFT: Molecular orientation and intracellular photometric analysis. *Science* **111**, 68—71 (1950). — RIS, H.: The composition of chromosomes during mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 158—160 (1947). — RIS, H., and A. E. MIRSKY: Quantitative cytochemical determination of deoxyribonucleic acid with the Feulgen nuclear reaction. *J. Gen. Physiol.* **33**, 125—145 (1949). — SCHRADER, F., and C. LEUCHTENBERGER: Variation in the amount of deoxyribosenucleic acid in different tissues of *Tradescantia*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **35**, 464—468 (1949). — A cytochemical analysis of the functional interrelations of various cell structures in *Arvelius albopunctatus* (DE GEER). *Exper. Cell. Res.* **1**, 421—452 (1950). — SCHREIBER, G.: Statistical and physiological studies on the interphasic growth of the nucleus. *Biol. Bull.* **97**, 187—205 (1949). — STEFANO, H. S. DI: A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. *Chromosoma* **3**, 282—301 (1948). — STOWELL, R. E.: Photometric histochemical determination of thymonucleic acid in experimental epidermal carcinogenesis. *J. Nat. Cancer. Inst.* **3**, 111—124 (1942). — Feulgen reaction for thymonucleic acid. *Stain. Technol.* **20**, 45—56 (1945). — The specificity of the Feulgen reaction for thymonucleic acid. *Stain. Technol.* **21**, 137—148 (1946). — STRAUB, J.: Neuere karyologische Probleme und Ergebnisse. IV. Die Spiralstruktur der Chromosomen. *Z. Bot.* **33**, 65—126 (1938). — SWIFT, H. H.: The deoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiol. Zool.* **23**, 169—198 (1950). — The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **36**, 643—654 (1950). — TAYLOR, J. H.: Autoradiographic detection of incorporation of  $P^{32}$  into chromosomes during meiosis and mitosis. *Exper. Cell. Res.* **4**, 167—173 (1953). — WIDSTRÖM, G.: Über die Verwendbarkeit der SCHIFFSchen Fuchsin-schwefligsäure-reaktion zur quantitativen Bestimmung von Thymonukleinsäure. *Biochem. Z.* **199**, 298—306 (1928).

Prof. Dr. Dr. H. MARQUARDT,

Forstbotanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.

Dr. E. GRUNDMANN,

Pathologisches Institut der Universität Freiburg (Ludwig-Aschoff-Haus).

Aus dem Staatsinstitut für Allgemeine Botanik, Hamburg.

## ÜBER POLYSOMATIE IN DER WURZEL VON BRYONIA.

Von

FRANZ BRABEC.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. August 1953.)

### Einleitung.

Durch eine Reihe von besonders daraufhin angestellten Untersuchungen (LANGLET 1927, WULFF 1936 und 1940, D'AMATO 1950 und 1952, AVANZI 1950, HOLZER 1951) ist sichergestellt worden, daß bei vielen Pflanzen die Gewebedifferenzierung in der Wurzel mit Polysomatie verbunden ist. Dabei ist offenbar geworden, daß die Erscheinung in ganz verschiedenen Verwandtschaftskreisen vorkommt. In der Familie der *Cucurbitaceen* ist sie bisher für verschiedene Kultursorten der Gattungen *Cucurbita*, *Cucumis* und *Citrullus* (KOSHUCHOW 1928, RUTTLE 1931, ERVIN 1941) bekanntgeworden. Im folgenden sollen Befunde an der Gattung *Bryonia* hinzugefügt werden.

### Material und Methode.

Samen von *Bryonia alba* L., *B. dioica* Jacq. und *B. verrucosa* Arr.<sup>1</sup> wurden 48 Std in Leitungswasser eingequollen und in Petrischalen auf Fließpapier im Brutschrank bei einer Temperatur von 23—24° C zum Keimen gebracht. Die Keimfähigkeit von *B. verrucosa* betrug fast 100%, die der einheimischen *Bryonien* nur etwa 60—70%, und es traten mancherlei Keimlingsmißbildungen auf. Zur Untersuchung wurden nur normal entwickelte und rasch wachsende Wurzeln benutzt. Die Sämlingswurzeln wurden ab 5 mm Länge zur Herstellung von Quetschpräparaten in Alkohol/Eisessig 3:1 fixiert und mit Orcein-Essigsäure gefärbt (DARLINGTON und LA COUR 1947). Zum Vergleich wurden weitere Wurzeln teils nach BENDA, teils nach NAVASHIN fixiert, in Paraffin eingebettet und 10  $\mu$  quer und längs geschnitten. Die Schnitte wurden nach der Gentionaviolett-Jod-Methode gefärbt (JOHANNSEN 1940).

Zeichnungen wurden unter Verwendung von teils Leitz Apochromat 92 $\times$ , teils Zeiß Phako 90 $\times$ , mit Kompensationsokularen Zeiß 15 $\times$  und 20 $\times$  mit dem großen Abbéschen Zeichenapparat von Zeiß hergestellt. Mikrophotographien wurden mit einem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellten Zeiß-Mikrophotografenaufsatz in Verbindung mit der Contax hergestellt. Als Aufnahmемaterial wurde Agepe-Dokumentenfilm von Agfa verwandt.

<sup>1</sup> Samen von *Bryonia verrucosa* Arr. wurden freundlicherweise vom Jardin de Acclimatacion, Orotava, Tenerife, geschickt, wofür an dieser Stelle herzlich gedankt sei.

## Ergebnisse.

Die canarische *Bryonia verrucosa*, die cytologisch bisher nicht untersucht worden ist, stimmt in der Chromosomenzahl mit den beiden

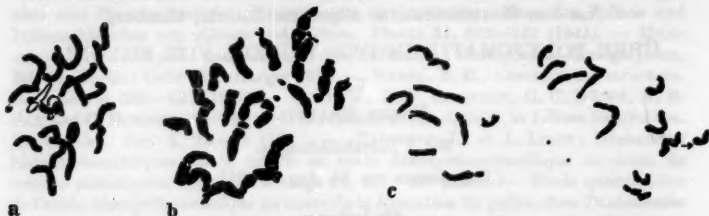


Abb. 1a—c. *Bryonia verrucosa*. a Metaphase in Wurzelmeristemzelle, 2 Satelliten, Nava-shin-Gentianaviolett; b Metaphase, 2 Satelliten. Wurzel-Quetschpräparat, Orceinssigsäure; c Prophase in 2 Einstellungen, Satelliten in weitem Abstand von ihren Trägerchromosomen, Quetschpräparat, Orceinssigsäure. Vergr. in allen Fällen etwa 1900  $\times$ .

einheimischen Arten überein, sie hat  $2n = 20$  Chromosomen. Auch im Besitz von 2 Satelliten (RESENDE 1937) besteht Übereinstimmung (Abb. 1). Da für die vorliegende Untersuchung wesentliche Unter-

schiede zwischen den 3 Arten nicht gefunden wurden, gilt alles Folgende gleichermaßen für alle 3 Arten.

Man findet bei allen 3 *Bryonia*-Arten ohne jede Vorbehandlung mit mitoseanregenden Mitteln disomatische (= tetraploide) Mitosen im Periblem in einiger Entfernung vom Vegetations-scheitel. In Übereinstimmung mit Befunden an anderen Objekten treten auch hier die Chromosomen häufig gepaart, zuweilen auch ungepaart auf. In der frühen Prophase erscheinen die Paarlinge zopfartig umeinandergewunden (Abb. 2, 3, 7). Eine Entscheidung, ob die Centromeren bereits gespalten sind, ist vielfach schwierig. Im weiteren Verlauf der Prophase tritt allmählich eine Trennung ein (Abb. 6), aber die Paare bleiben fast immer gut erkennbar. Die paarweise Anordnung kann bis in die Metaphase andauern.



Abb. 2. *Bryonia alba*. Frühe disomatische Prophase in 2 Einstellungen, verschiedene Grade der Verschlingung der Paare bis zu völliger Trennung und Parallellagerung zeigend. In manchen Fällen bereits die Chromatiden der mitotischen Spaltung erkennbar. Zum Teil noch sehr enge Paarung, wobei es zweifelhaft erscheint, ob hier die Centromerenspaltung schon vollzogen ist.

Daneben werden jedoch auch disomatische Pro- und Metaphasen ohne solche Paarungen gefunden. Daraus kann geschlossen werden, daß die zur Disomatie führende Endomitose bereits genügend lange Zeit



zurückliegt, um bis zum Beginn der nächstfolgenden Mitose eine räumliche Trennung der Spaltungsprodukte ermöglicht zu haben. Die Untersuchung der Schnittpräparate ergab, daß die geschilderten Vorgänge fast nur im Periblem ablaufen. Sie wurden weder im Plerom noch im Dermatogen gefunden. Dagegen wurde ein sicherer Fall von Disomatie in der Kalyptra gefunden. Damit ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß im Zuge der weiteren Differenzierung auch außerhalb des Periblems die Chromosomenzahl endomitotisch erhöht werden kann; es ist nur ohne Mitoseanregung nicht erkennbar. Für das Plerom ist es jedoch wegen der dort vorgefundenen Zell- und Kerngrößen unwahrscheinlich. Im Periblem kommen zweifellos noch weitere endomitotische Erhöhungen der Chromosomenzahl über die disomatische Stufe hinaus vor. Darauf weist das seltene Vorkommen polysomatischer Mitosen hin. Es wurden je einmal eine tetrasomatische (Abb. 4) und eine schätzungsweise oktosomatische Mitose gefunden. Da nur unbehandelte Wurzeln untersucht wurden und polysomatische Kerne offenbar nur selten noch Mitosen durchführen, kann über die eventuell noch erreichbaren höheren Stufen sowie deren Häufigkeit nichts ausgesagt werden. Nach dem bisher bei Wurzeln Bekanntgewordenen ist mit einer wesentlichen Erhöhung über die 16n-Stufe hinaus wohl nicht zu rechnen, wenn man von der für Trichocytenkerne geschätzten Endstufe von  $32n$  (GEITLER 1940) absieht. Grundsätzlich ist jedenfalls durch die mitgeteilten Ergebnisse der gesetzmäßige Zusammenhang zwischen der Differenzierung des Wurzelgewebes und endomitotisch bedingter Polysomatie für *Bryonia* nachgewiesen.

An Längsschnitten wurden die Entfernungen vom Vegetations Scheitel gemessen, in denen disomatische Mitosen auftreten. Im Mittel

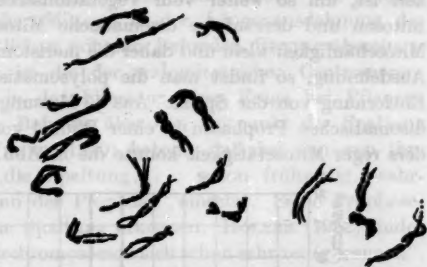


Abb. 3. *Bryonia verrucosa*. Frühe disomatische Prophase. Gleicher Kommentar wie 2. Beide Orceinossigsäure-Quetschpräparate. Vergr. etwa 1900 x.

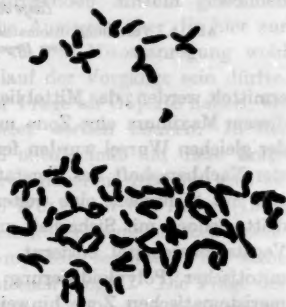


Abb. 4. *Bryonia verrucosa*. Tetrasomatische Metaphase aus dem Periblem, Navaashin-Gentianaviolett. Vergr. etwa 2300 x.

wurde aus 70 Messungen an 11 Wurzeln eine Entfernung von etwa  $450 \mu$  errechnet. Im Einzelfall steht jedoch die Entfernung in Beziehung zur Mitosehäufigkeit in der Wurzel. Je größer die Mitosehäufigkeit ist, um so weiter vom Vegetationsscheitel entfernt sind Endomitosen und demzufolge disomatische Mitosen zu erwarten. Ist die Mitosehäufigkeit klein und daher die meristematische Zone von geringer Ausdehnung, so findet man die polysomatischen Mitosen in geringer Entfernung von der Spitze. Aus 43 Messungen der Entfernungen von disomatischen Prophasen in einer Wurzel von *B. verrucosa* mit besonders reger Mitosetätigkeit konnte die in Abb. 5 dargestellte Verteilung

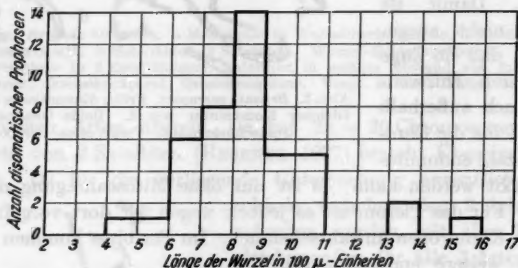


Abb. 5. Verteilung disomatischer Mitosen (Prophasen) über die Länge einer *Bryonia verrucosa*-Wurzel.

ermittelt werden; das Mittel liegt hier bei  $860 \mu$ . Es muß also wenig vor diesem Maximum eine Zone maximaler Endomitosetätigkeit liegen. In der gleichen Wurzel wurden ferner 3 disomatische Metaphasen in nächster Nachbarschaft des Vegetationsscheitels gefunden. Davon gehörten eine mit Sicherheit, eine weitere sehr wahrscheinlich zur Kalyptra, die dritte jedoch mit Sicherheit zum Periblem. Diese war nur  $185 \mu$  vom Vegetationsscheitel entfernt. Das würde auf die Möglichkeit endomitotischer Polyploidisierung auch bereits innerhalb der jüngeren meristematischen Zone hinweisen. Jedoch ist dieser Fund ein Einzelfall geblieben, so daß allgemeine Schlüsse daraus nicht gezogen werden können.

#### Besprechung der Ergebnisse.

Nach dem im vorausgegangenen Abschnitt Ausgeführten ist es offenbar, daß die karyologischen Differenzierungsvorgänge bei den untersuchten *Bryonia*-arten in Übereinstimmung mit der Feststellung GETTLERS (1948) verlaufen, daß „die endomitotische Polyploidie schon vor dem Erlöschen der mitotischen Teilungsfähigkeit einsetzt“. Ferner besteht mit den älteren Angaben über Polysomatie bei *Cucurbitaceen* (KOSHUCHOW 1928, RUTTLE 1931, ERVIN 1941) insofern Übereinstim-

mung, als die Polysomatie hier wie dort im wesentlichen auf das Periblem beschränkt ist. ERVIN fand jedoch bei *Cucumis Melo* „a fair number of polysomatic cells, especially disomatic . . . . in the dermatogen“ und einige wenige Fälle von Disomatie im Plerom. Die Häufigkeitsverteilung disomatischer Mitosen in der Längenausdehnung der Wurzel stimmt im wesentlichen mit den Befunden ERVINS überein.

Eine besondere Frage ist die der endomitotischen Centromerenspaltung. Soweit bisher in der Literatur diese Frage bei Pflanzen behandelt wurde, sind die Befunde über den Zeitpunkt der Spaltung nicht ganz eindeutig. WULFF (1940) betont, daß bei den von ihm untersuchten *Aizoaceen* „die Spaltung . . . schon frühzeitig, wahrscheinlich schon vor Beginn der Prophase“ einsetzt. Seine Prophasebilder lassen die vollzogene Spaltung erkennen. HOLZER (1952) findet bei *Iris*, daß „die Schwesterchromosomen sich schon sehr zeitig trennen“.

Bei *Ornithogalum* und *Zea*, die eine starke prophasische Verschlingung der Chromosomenpaare zeigen — wie in unserem Fall —, läßt der gleiche Autor die Frage offen, „ob ein Zusammenhalt am Centromer besteht“, hält jedoch „eine verzögerte Trennung der Centromeren“ für wahrscheinlich.

Vielleicht sind aber die Befunde HOLZERS sowie alle diejenigen anderen, die auf Grund von mitoseanregenden Mitteln gewonnen wurden, nicht ganz geeignet, verbindliche Aussagen über die hier zur Diskussion stehende Frage zu machen, da die Mitoseanregung wohl auch von Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Vorgänge sein dürfte. Man muß sich also zur Beurteilung dieser Frage an Objekte halten, bei denen die Vorgänge ungestört beobachtet werden können. In der älteren Literatur über Polysomatie wird naturgemäß auf diese Frage noch nicht eingegangen. In vergleichbaren neueren Arbeiten wird sie außer in dem bereits zitierten Befund von WULFF nur von ERVIN (1941) bei der Besprechung der Prophasestadien folgendermaßen behandelt: „The chromosomes of most pairs are completely separated, but some are in contact throughout part or most of their length.“ Die Frage der Spaltung oder Nichtspaltung der Centromeren wird jedoch nicht eigentlich berührt. Es heißt lediglich an späterer Stelle: „In those di- and tetrasomatic equatorial plates which present the most conspicuous pairing, the chromosomes of a pair remain closely associated longest at their centromeres.“ Damit ist jedoch keineswegs eine Nichtspaltung zum Ausdruck gebracht, was im Metaphasestadium ja auch entschieden ungewöhnlich wäre. Die von ERVIN gebrachten Prophasebilder sind wenig aufschlußreich.

Im Falle der Bryonien ist in sehr frühen Prophasen die Verschlingung der Chromosomenpaare meist sehr eng (Abb. 2, 3, 7). Wenn dann noch die beiden Chromosomen in dem entscheidenden Abschnitt in

Blickrichtung hintereinanderliegen (Abb. 7a und b) gewinnt man leicht den Eindruck, daß eine Spaltung am Centromer noch nicht erfolgt ist. Liegen jedoch die Chromosomen in Aufsicht nebeneinander (Abb. 7c bis e), so muß man sich doch wohl dahin entscheiden, daß auch in den frühesten Prophasestadien die Centromerenspaltung bereits vollzogen ist. Es ist mir jedenfalls nicht möglich gewesen, einen wirklich zuverlässigen Fall von Nichtspaltung nachzuweisen. Zusammenfassend



Abb. 6.

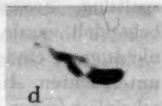
Abb. 6. *Bryonia alba*. Gruppen von Chromosomenpaaren aus einer späten diplotenischen Prophase. Quetschpräparat, Orceinssigsäure. Vergr. etwa 2500  $\times$ .



a



b



d



c



e

Abb. 7a—e.

Abb. 7a—e. *Bryonia verrucosa*. Sehr frühe diplotenische Prophase. a und b 2 Fälle, in denen die Centromerenspaltung zweifelhaft erscheinen kann, mit c—e deutlicher Centromerenspaltung. Quetschpräparat, Orceinssigsäure. Vergr. etwa 4000  $\times$ .

kommen wir zu der Feststellung, daß die endomitotische Centromerenspaltung höchstwahrscheinlich vollzogen ist, ehe die mitotische Prophase beginnt.

#### Zusammenfassung.

Die Chromosomenzahl von *Bryonia verrucosa* AIT. beträgt  $2n = 20$ . Es sind 2 Satelliten vorhanden.

Bei den untersuchten Arten *Bryonia alba* L., *B. dioica* JACQ. und *B. verrucosa* AIT. ist das Wurzelperibrem polysomatisch.

Für *B. verrucosa* konnte auch Polysomatie in der Kalyptra nachgewiesen werden. Im Dermatogen und Plerom wurden keine Anzeichen von Polysomatie gefunden.

Der Zeitpunkt der endomitotischen Centromerenspaltung wird diskutiert.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Joachim Jungius-Gesellschaft der Wissenschaften zu Hamburg durchgeführt.

#### Literatur.

Für weitere Literatur sei insbesondere auf die Arbeit von HOLZER verwiesen.

AVANZI, M. G.: Ricerche sulla poliploidia somatica nei tessuti differenziati della radice di alcune Graminaceae. Caryologia 3, 351—369 (1950). — D'AMATO, F.: Differenziazione istologica per endopoliploidia nelle radici di alcune monocotile-

doni. *Caryologia* 3, 11—26 (1950). — New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. *Caryologia* 4, 121—144 (1952). — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR.: The handling of chromosomes. London 1947. — ERVIN, C. D.: A study of polysomy in *Cucumis Melo*. *Amer. J. Bot.* 28, 113—121 (1914). — GEITLER, L.: Die Polyploidie der Dauergewebe höherer Pflanzen. *Ber. dtsch. bot. Ges.* 58, 131—142 (1940). — Ergebnisse und Probleme der Endomitoseforschung. *Österr. bot. Z.* 95, 277—297 (1948). — HOLZER, K.: Untersuchungen zur karyologischen Anatomie der Wurzel. *Österr. bot. Z.* 99, 118—155 (1952). — JOHANNSEN, D. A.: Plant microtechnique. New York u. London 1940. — KOSCHUCHOW, Z. A.: Über experimentelle Chromosomenzahlverdoppelung in den somatischen Zellen mit abnormen Temperaturen. *Angew. Bot.* 10, 140—148 (1928). — LANGLET, O.: Zur Kenntnis der polysomatischen Zellkerne im Wurzelmeristem. *Sv. bot. Tidskr.* 21, 397—422 (1927). — RESENDE, F.: Über die Ubiquität der SAT-Chromosomen bei den Blütenpflanzen. *Planta* 26, 757—807 (1937). — RUTTLE, M. L.: Chromosome number in the genus *Cucurbita*. *N.Y. State Agric. Exper. Stat., Techn. Bull.* 1931, No 186. — WULFF, H. D.: Die Polysomie der *Chenopodiaceen*. *Planta* 26, 275—290 (1936). — Die Polysomie des Wurzelperilems der *Aizoaceen*. *Ber. dtsch. Bot. Ges.* 58, 400—410 (1940).

Dr. FRANZ BRABEC, Hamburg, Staatsinstitut für Allgemeine Botanik.

Institute of Genetics, University of Lund, Sweden.

## PAIRING AND TRANSMISSION OF A SMALL ACCESSORY ISO-CHROMOSOME IN RYE.

By

A. MÜNTZING and A. LIMA-DE-FARIA.

With 23 figures in the text.

(Eingegangen am 3. August 1953.)

In some populations of rye (*Secale cereale*) accessory chromosomes („B chromosomes“) occur in addition to the normal somatic chromosome complement consisting of 14 „A“ chromosomes (cf. MÜNTZING 1949). The standard type of B chromosome, having a subterminal centromere, is not quite stable but has been observed to give rise to derivatives which are structurally changed. Some of them represent deficiencies (cf. MÜNTZING and LIMA-DE-FARIA 1952) others have been supposed to be iso-chromosomes, representing twice the long arm or twice the short arm of the standard type (MÜNTZING 1944). By pachytene studies the supposed constitution of the large „iso-fragment“ could be definitely verified (MÜNTZING and LIMA-DE-FARIA 1949). The present paper represents a similar study of the so-called small iso-fragment.

In somatic metaphase plates this chromosome is quite small and dumbbell-shaped with a median constriction separating two arms, each having the size of the short arm of the standard type of B chromosome (MÜNTZING 1944, fig. 18—19). Pachytene analysis of this chromosome has been delayed owing to the fact that, in contrast to the standard B and the large iso-fragment, the small iso-fragment does not possess the ability of undergoing non-disjunction at the first pollen mitosis and at the corresponding stage on the female side (MÜNTZING 1945, 1946). For that reason it is difficult to obtain daughter plants with 2 such iso-fragments. However, only in plants having 2 (or more) small iso-fragments, in which these chromosomes have an opportunity to pair with each other, it is possible to make an accurate pachytene analysis of this chromosome. In plants with a single iso-fragment we have not been able to study this unpaired chromosome at pachytene in a satisfactory way.

### Transmission of the small iso-fragment.

In Table 1 all data available concerning the transmission of the small iso-fragment („sif“) are summarized. In plants with  $2n = 14 + 1$  sif the unpaired extra chromosome is frequently eliminated at meiosis. This is evident from intercrosses between normal rye plants („14“)



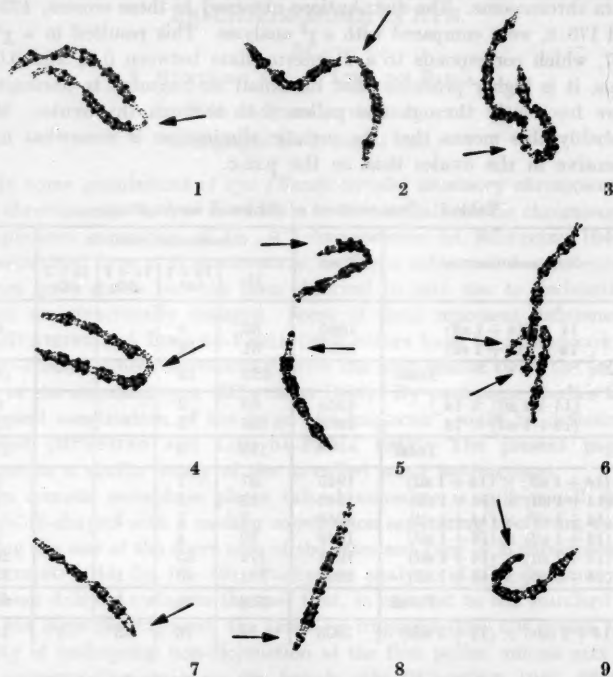
and plants of the constitution  $14+1$  *sif*. In the combination  $14 \times (14+1 \text{ *sif*})$  13.4 per cent of the plants contained the *sif*. In the reciprocal cross,  $(14+1 \text{ *sif*)} \times 14$  the proportion of plants with the *sif* was still lower, only 4.5 per cent of the 178 plants examined carrying the extra chromosome. The distributions obtained in these crosses, 123:19 and 170:8, were compared with a  $\chi^2$  analysis. This resulted in a  $\chi^2$  of 8.07, which corresponds to a *P* intermediate between 0.01 and 0.001. Thus, it is highly probable that the small iso-fragment is transmitted more frequently through the pollen than through the ovules. Most probably this means that the meiotic elimination is somewhat more intensive in the ovules than in the p.m.c.

Table 1. *Transmission of the small iso-fragment.*

Cross combination	Year	Chromosome numbers				n
		14	14 + 1 <i>sif</i>	14 + 2 <i>sifs</i>	14 + 3 <i>sifs</i>	
14 $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1945	62	5			67
14 $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1950	61	14			75
Total		123	19			142
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ 14	1945	65	3			68
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ 14	1950	105	5			110
Total		170	8			178
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1945	57	7			64
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1946	20	3			23
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1948	7	1	1		9
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1949	20	4			24
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1951	171	35			206
(14 + 1 <i>sif</i> ) $\times$ (14 + 1 <i>sif</i> )	1952	291	40	4		335
Total		566	90	5		661
(14 + 2 <i>sifs</i> ) $\times$ (14 + 2 <i>sifs</i> )	1953	51	70	33	3	157

Intercrosses between plants having  $2n = 14 + 1$  *sif* were undertaken in 6 years, and in the offspring of such intercrossed plants a total of 661 individuals have been cytologically examined. As may be seen from Table 1 the number of *sifs* was 0 in 566 plants, 1 in 90 plants and 2 in 5 plants. From the backcrosses  $14 \times (14 + 1 \text{ *sif*)}$  and reciprocally we found that 1 *sif* was transmitted by 13.4 per cent of the pollen grains and 4.5 per cent of the ovules. Assuming the same rate of transmission in the intercrosses  $(14 + 1 \text{ *sif*)} \times (14 + 1 \text{ *sif*)}$  the expected values in the offspring would be 82.70 per cent without *sif*, 16.70 per cent with 1 *sif* and 0.60 per cent with 2 *sifs*. The absolute ratio obtained was 566:90:5 which corresponds to the percentage values 85.63, 13.62 and 0.76. Thus, the data from the intercrosses evidently agree rather well with those from the back crosses.

Table 1 also includes the result of an intercross between plants having  $14+2$  sifs. If the meiotic pairing had been regular and no elimination had occurred, all the daughter plants would have been expected to have 2 sifs like the parents. However, of the 157 plants



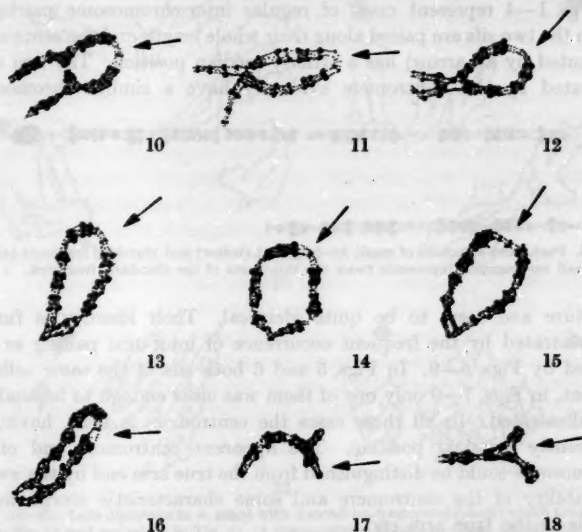
Figs. 1—9. Pachytene pairing in a plant with 2 small iso-fragments. Figs. 1—4, cases of regular inter-chromosome pairing. The two chromosomes paired along their whole length; the centromere (indicated by an arrow) with a strictly median position, separating identical arms. Figs. 5—9, cases of inter-arm pairing. The centromere is bent, having an apparently terminal position. Camera lucida drawings  $\times 2250$ .

examined only 22.9 per cent had 2 or (in a few cases) 3 sifs. The strong tendency to decrease in the number of sifs demonstrates that meiosis even in plants with 2 sifs must be rather irregular owing to incomplete pairing between the homologous sifs.

#### Cytological observations.

Some data on meiosis in plants with one sif have already been published (MÜNTZING 1944, p. 235—237). This chromosome was fre-

quently found to divide at I—A and to lag at II—A which explains the high degree of elimination. In the present material, consisting of plants having 2 sifs, the pairing of these chromosomes at first metaphase was found to be quite poor. Of 200 p.m.c. examined, 167 clearly showed the two sifs unpaired as in Fig. 23. In 11 cells only one unpaired sif could be discerned, the other one probably being hidden by the A chromosomes. In 6 cells the sifs formed a clear bivalent (Fig. 22) and in 16



Figs. 10—16. Cases of pairing involving changes of partner and resulting in pseudo-tetavalents. In Figs. 13—15 the changes of partner have a terminal position. In Figs. 10—15, one change of partner, in Fig. 16 two changes. Figs. 17—18, three armed structures showing partly non-homologous pairing. Camera lucida drawings  $\times 2250$ .

other cells such bivalents may have been present, no univalent sifs being visible. Thus, in something between 3 and 11 per cent of the p.m.c. the two sifs formed a small bivalent but in the great majority of the p.m.c. they were clearly unpaired.

In material of the same plant the pairing of the sifs was also observed at late diplotene and early diakinesis. At these stages the majority of the sifs were clearly associated with each other (Fig. 20), this being the case in 44 of 78 cells examined. In 28 cells the sifs were unpaired (Fig. 21) and in 6 cells the pairing was unclear. Thus, it is obvious that at earlier meiotic stages than first metaphase pairing between the sifs is much more frequent. In most cases, however, this pairing does not involve

chiasmata, and the associations are dissolved before first metaphase is reached.

The main purpose of the present investigation was to make a detailed study of the sif at pachytene, and in one plant with 14 + 2 sifs good pachytene pictures were obtained. Different pairing types were observed, representing inter-chromosome as well as inter-arm pairing or a combination of both.

Figs. 1—4 represent cases of regular inter-chromosome pairing in which the two sifs are paired along their whole length and the centromere (indicated by an arrow) has a strictly median position. The two arms separated by this centromere evidently have a similar chromosome



Fig. 19. Pachytene structure of small iso-fragment (below) and standard fragment (above). The small iso-fragment represents twice the short arm of the standard fragment.  $\times 2250$ .

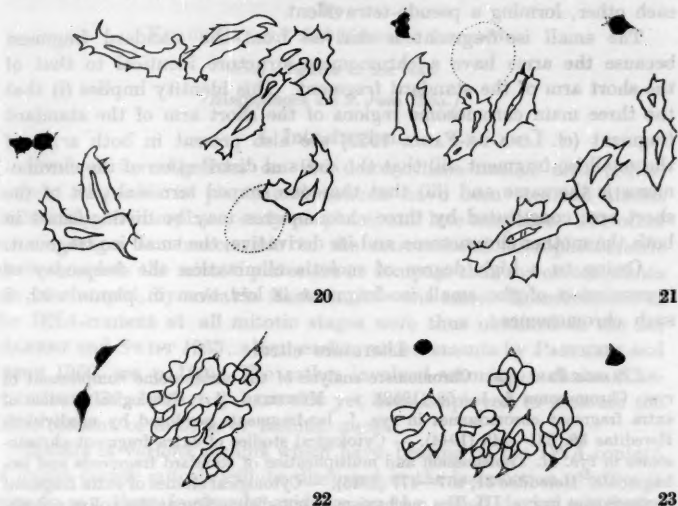
structure and seem to be quite identical. Their identity is further demonstrated by the frequent occurrence of inter-arm pairing as illustrated by Figs. 5—9. In Figs. 5 and 6 both sifs of the same cells are present, in Figs. 7—9 only one of them was clear enough to be analysed and illustrated. In all these cases the centromere is bent, having an apparently terminal position. The apparent centromere end of the chromosome could be distinguished from the true arm end by the weaker stainability of the centromere and some characteristic morphological details of the true arm end.

In a few cases the inter-arm pairing was deviating and in part non-homologous, giving rise to threearmed structures (Figs. 17—18). The probable position of the centromere is indicated by the arrows. In Figs. 10—12 the pairing between two sifs involves changes of partner, resulting in pseudo-tetravalents. Sometimes these changes of partner have a terminal position, giving rise to closed rings (Figs. 13—15). In rare cases two changes of partner may occur as demonstrated by Fig. 16.

Chromomere counts were undertaken and in the chromosome arms illustrated in Figs. 1—15 their number was found to range from 8 to 11 with an average of 9.9. In the centromere region the number of chromomeres possible to distinguish ranged from 0 to 2, 1 being the most frequent number (in case of Figs. 1—4 and 10—15).

The number of chromomeres now observed in the chromosome arms is closely similar to the number already known to occur in the short arm of the standard fragment. Size and distribution of chromo-

meres and fibrillae were also found to be similar in both cases (cf. LIMA-DE-FARIA 1952). This similarity is quite clear from Fig. 19, showing the standard fragment as well as the small iso-fragment of the same rye variety in question, Östgöta gråråg. From this figure it is quite obvious that the small iso-fragment really represents twice the short arm of the standard fragment as was originally assumed.



Figs. 20—21. Late diplotene in a plant with 2 small iso-fragments (black) which are associated in Fig. 20 and univalent in Fig. 21. A chromosomes in outline. Figs. 22—23, first metaphase in the same plant. Small iso-fragments forming a bivalent in Fig. 22, two univalents in Fig. 23. Camera lucida drawings  $\times 1250$ .

Thus, it is now clear that the small iso-fragment has arisen in a way analogous to that of the large iso-fragment. Previous pachytene studies demonstrated, indeed, that this chromosome represents twice the long arm of the standard fragment (MÜNTZING and LIMA-DE-FARIA 1949). In plants with two large iso-fragments these chromosomes may also show inter-arm pairing or may pair with each other along their whole length. Pairing of the latter kind may result in true bivalents which were observed to occur in about 26 per cent of the p.m.c. at first metaphase (MÜNTZING 1951). True bivalents composed of two small iso-fragments may also be formed but in a quite low frequency. This difference in bivalent frequency between the large and small iso-fragments is, of course, primarily caused by the large difference in size between the two chromosome types.

### Summary and conclusions.

A small derivative of the standard type of B chromosome in rye was definitely demonstrated to be an iso-chromosome, (i) because both arms have the same chromomere structure, (ii) because the two arms of the same chromosome frequently pair with each other and (iii) because the four arms of a bivalent at pachytene may exchange partners with each other, forming a pseudo-tetravalent.

The small iso-fragment is derived from the standard fragment because the arms have a chromomere structure identical to that of the short arm of the standard fragment. This identity implies (i) that the three main chromosome regions of the short arm of the standard fragment (cf. LIMA-DE-FARIA 1952) are also present in both arms of the small iso-fragment, (ii) that the size and distribution of the chromomeres is the same and (iii) that the cone shaped terminal part of the short arm constituted by three chromomeres may be distinguished in both the mother chromosome and its derivative, the small iso-fragment.

Owing to a high degree of meiotic elimination the frequency of transmission of the small iso-fragment is low even in plants with 2 such chromosomes.

### Literature cited.

- LIMA-DE-FARIA, A.: Chromomere analysis of the chromosome complement of rye. *Chromosoma* 5, 1—68 (1952). — MÜNTZING, A.: Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. I. Iso-fragments produced by misdivision. *Hereditas* 30, 231—248 (1944). — Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. II. Transmission and multiplication of standard fragments and iso-fragments. *Hereditas* 31, 457—477 (1945). — Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. III. The mechanism of non-disjunction at the pollen mitosis. *Hereditas* 32, 97—119 (1946). — Accessory chromosomes in *Secale* and *Poa*. Proc. eighth int. Congr. Genetics, *Hereditas*, Suppl. Vol. pp. 402—411 (1949). — The meiotic pairing of iso-chromosomes in rye. *Port. Acta Biol. A. R. B. GOLDSCHMIDT* Vol., pp. 831—860 (1951). — MÜNTZING, A., and A. LIMA-DE-FARIA: Pachytene analysis of standard fragments and large iso-fragments in rye. *Hereditas* 35, 253—268 (1949). — Pachytene analysis of a deficient accessory chromosome in rye. *Hereditas* 38, 1—10 (1952).

Prof. Dr. A. MÜNTZING,

Genetiska Institutionen Lunds Universitet, Lund (Schweden).



From the Department of Botany, University of Wisconsin, Madison,  
and the Whitman Laboratory, University of Chicago.

## THE DNA-CONTENT (FEULGEN) OF NUCLEI DURING MITOSIS IN A ROOT TIP OF ONION.

By

KLAUS PATAU\* and HEWSON SWIFT\*\*.

With 2 figures in the text.

(Eingegangen am 9. Juni 1953.)

### I. Introduction.

Previous investigations on the desoxyribose nucleic acid (DNA) content of nuclei in plants and animals have been confined almost exclusively to interphase, early prophase, and late telophase. The other mitotic stages are inaccessible to the conventional microphotometric method, unless the mitotic plates are so compact that the chromosomes can be clumped, by suitable fixation, into one mass. Measurements of the DNA-content at all mitotic stages were thus obtained in the rat (ALFERT and SWIFT 1953; about earlier measurements by PASTEELS and LISON 1950, see p. 160). The rather involved scanning technics (CASPERSSON 1936, 1950 etc.) have not yet been employed to measure the DNA-content of mitotic or meiotic nuclei.

Results of various authors which have bearing on the DNA-content of nuclei during mitosis will be discussed in the last section. Suffice it here to say there is already evidence on the period during which the DNA-content is doubled. Most likely this always occurs during interphase or possibly very early prophase (leptotene in *Tradescantia*). In the root meristems of *Vicia*, *Rhoeo*, and *Tradescantia* it is terminated well before the visible onset of prophase. Changes in the DNA-content of chromatids during mitosis, if such take place, should consequently be only temporary. It will be explained in the discussion why, in our opinion, strict constancy of the DNA-content per chromatid may still be regarded as a tenable working hypothesis, though certainly as no more than that. If cyclic changes, apart from the doubling, of the DNA-content should occur they might well be related to changes in

\* Contribution from the Program in Cytology, Department of Botany, University of Wisconsin, Madison, supported in part by grants to Dr. C. LEONARD HUSKINS from the Rockefeller Foundation, the American Cancer Society, and the Research Committee of the Graduate School with funds supplied by the Wisconsin Alumni Research Foundation.

\*\* Whitman Laboratory, University of Chicago; supported in part by the U. S. Public Health Service and the Wallace C. and Clara A. Abbott Memorial Fund.

chromosome structure during mitosis. Accurate DNA measurements at all mitotic stages are obviously needed.

Such measurements have now become feasible by a new microphotometric method which employs two wavelengths instead of one (ORNSTEIN 1952, PATAU 1952). It is capable of reducing optical errors in a spectacular manner and can be applied with almost equal reliability to all sufficiently stained cytological objects, regardless of their structure. The new method requires a very uniform, monochromatic, illumination of a much larger field (depending on the size of the object to be measured) than the conventional method. It also requires a uniform response of the phototube to light coming from different parts of the field. The present measurements had to be done with an optical set-up which was far from adequate in these respects. The obtained results, though not representative for the potential accuracy of the method, are nevertheless clearly superior to any which could possibly be achieved with the same material by the conventional method.

For the sake of comparison, the measurements of mitotic nuclei had to be complemented by others of interphase nuclei which were not in the process of DNA-synthesis. For this purpose large interphase nuclei were selected under the presumption that the situation in onion would not be different from that in *Rhoeo* (PATAU 1952) and *Tradescantia* (SWIFT 1953), wherein the largest interphase nuclei have already completed the doubling of their DNA-content.

## II. Material and Methods.

All measurements were done on a single slide. A  $150\mu$  thick, longitudinal section of a living onion root was made under water by a microtome with vibrating knife (designed by PERSIDSKY 1953). The section was immediately fixed in acetic alcohol 1:3. This method should ensure a very uniform fixation of all nuclei and, therefore, be a safeguard against at least one source of proportionality error (see the discussion). Experience indicates that the contents are washed out of all cells into which the knife has penetrated so deeply as to touch the nucleus. The mitoses measured had, as far as could be determined, the normal chromosome number of  $2n = 16$ . The section was hydrolyzed for ten minutes in normal hydrochloric acid, Feulgen-stained, squashed in 45% acetic acid, and mounted in Canada balsam.

The measurements were done with the same instrument which the second author has so far been using for the conventional method: a Beckman model DU spectrophotometer with quartz prism as monochromator, Leitz apochromat  $40\times$ , eyepiece  $10\times$  and photoelectric equipment as described by SWIFT (1950, b). To what extent the phototube response was uniform must be left as an open question. The diameter of the measured field ranged from about  $11\mu$  to  $27\mu$  (figure 1) corresponding to areas (in arbitrary units) of  $B = 23.2$  to  $B = 145.4$ . The instrument, which was not originally set up to illuminate such relatively very large fields, was adapted for the present purpose by improvised adjustments which, however, left the larger fields noticeably non-uniform. The present equipment would be adequate for all but the most exacting applications of the two-wavelength method, if a

correctly chosen lens in front of the exit slit were added (see the discussion) and if uniformity of the phototube response were ensured.

A relatively very homogeneous interphase nucleus served as test object (cf. PATAU 1952). Starting with  $\lambda_1 = 490 \text{ m}\mu$ ,  $\lambda_2 = 514 \text{ m}\mu$  was found to satisfy  $E(\lambda_2) = 2 E(\lambda_1)$  ( $= 0.78$ ). At these wavelengths, the slit width corresponded to about 2.1 and 2.25  $\text{m}\mu$  respectively. A narrower band width would obviously be desirable. For highly accurate work it would, further, be advisable to use wavelengths with somewhat lower extinctions.

All nuclei to be measured were selected beforehand and no readings, apart from the first eight of the main series (which were discarded as settling-in readings), have been omitted from the results. All measurements, except the first few preliminary ones, were done in sequences of two quadruples each (one at  $\lambda_1$ , the other at  $\lambda_2$ ) as described by PATAU (1952, cf. the sample computation of table 3). From each pair of quadruples a DNA-value in arbitrary units was computed.  $\gamma$ , the DNA-content per nucleus, as listed in figure 1, always stands for the mean of two such values, or "replications" (each based on eight readings) with the exception of the last anaphase. For each side of this the mean of four replications is given, each of us having determined two replications. We obtained virtually the same totals (19.56 and 19.73). Altogether, 308 readings have been incorporated in the results reported here.

### III. Results.

Preliminary measurements were made, while experimenting with the illumination and the sequence of readings, on one metaphase (11 quadruples of readings) and one late prophase nucleus (18 quadruples of readings including those in table 3 of the paper by PATAU 1952). The means obtained were  $\gamma = 20.0$  for the metaphase and  $\gamma = 22.6$  for the prophase. For the main series, nuclei different from the above were selected.

The following is based on the results from the main series (summarized in figure 1) as they are presumably the most reliable ones. With two replications (or more) per nucleus the random inaccuracies ("noise" in the widest sense) of the photometric readings can be assessed by means of the standard error  $s_1(\gamma)$  of the average  $\gamma$  of replications from the same nucleus. With only two replications  $s_1(\gamma)$  is simply one half of their difference. Now, the variation of replications and, hence, the expected  $s_1(\gamma)$  is not the same for all nuclei. Noise in the present case was probably largely due to variation in the lamp output. It can, then, easily be shown that with our method of measurement (cf. PATAU 1952), with fairly high field transmissions,  $T$ , and with only moderate variation of  $Q = L_2/L_1$  ( $L_1$  and  $L_2$  being the relative losses of light due to absorption at the wave lengths  $\lambda_1$  and  $\lambda_2$  respectively:  $L = 1 - T$ ),  $s_1(\gamma)$  should, on the average, be approximately proportional to  $\gamma/L_1$ . The observed values of  $s_1(\gamma)$  agree well enough with a curve fitted to them according to this expectation (figure 2). Actually these data are composed of two different samples: Up to middle anaphase (dots in figure 2) only single fields containing the whole nucleus were measured. In the case of the

last two anaphases and the telophases both daughter nuclei were measured separately. The sum of corresponding replications, one from each daughter nucleus, forms one replication of the DNA-content per total mitosis. In these cases  $s_1(\gamma)$  is based on such "total" replications

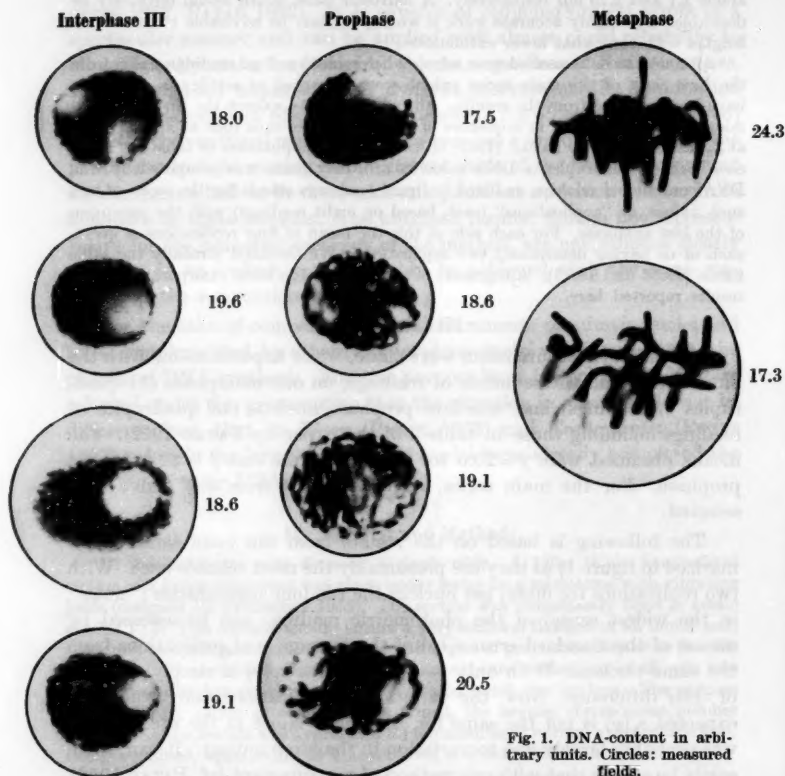


Fig. 1. DNA-content in arbitrary units. Circles: measured fields.

(crosses in figure 2). The two samples differ in various ways [not only in the sum formation which would lower the expected  $s_1(\gamma)$  by  $1/\sqrt{2}$ ] but figure 2 indicates that they can be pooled.

$L_1$  becomes smaller, that is,  $s_1(\gamma)$  becomes larger, with increasing empty area in the measured field. For this reason the measurements of metaphases and anaphases show a higher noise level than earlier and later stages (figure 2). The former (with a mean  $L_1=0.128$ ) would

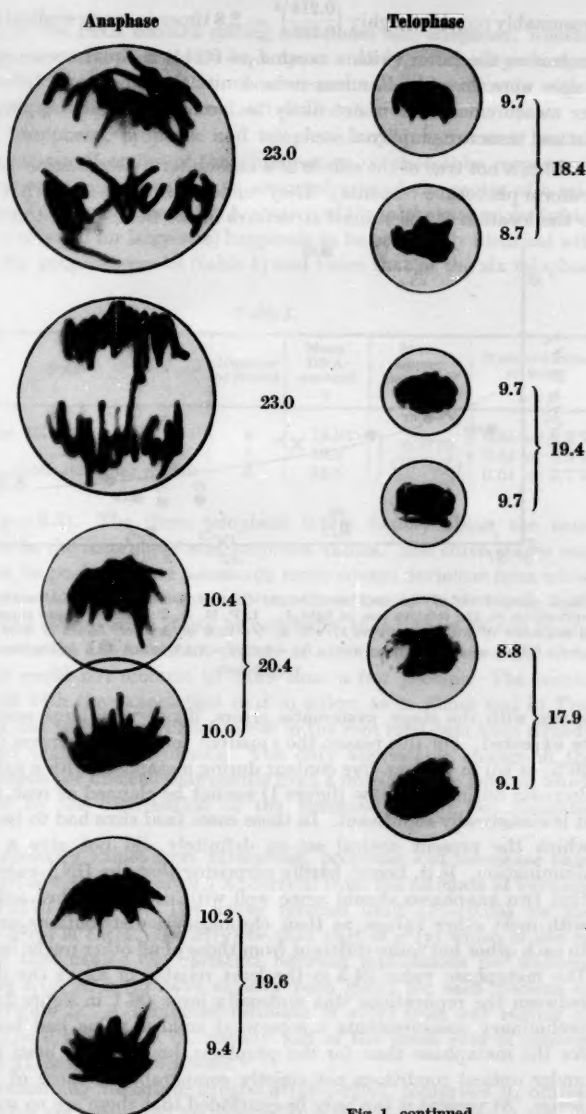


Fig. 1, continued.

presumably require roughly  $\left(\frac{0.214}{0.128}\right)^2 = 2.8$  times as many replications per nucleus as the latter (with a mean  $L_1 = 0.214$ ) if equal accuracy for all stages were desired. Random noise limits the amount of information per measurement but is not likely to be misleading if the proper statistical tests are employed.

This is not true of the effects of a non-uniform illumination (or a non-uniform phototube response). They render the results somewhat subject to the location of the stained structures in the field. Since this location

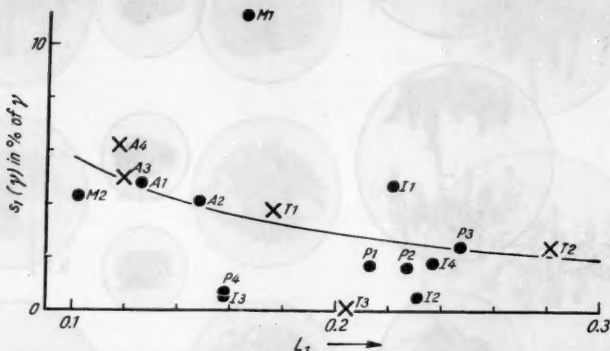


Fig. 2. Regression of the coefficient of variation of the mean  $\gamma$  (DNA-content) of two replications on the relative loss of light  $L_1$ . I, P, M, A, T: nuclear stages (numbers refer to sequence of nuclei in figure 1). N. B.  $\gamma = 19.6$  of A4 (cf. figure 1) does not have  $s_1(\gamma) = 6.2\%$ , as entered here, but  $s_1(\gamma) = 6.2/\sqrt{2} = 4.4\%$  since 19.6 is the mean of four replications.

varies with the stage, systematic errors, if not very large ones, are to be expected. For this reason the apparent temporary increase (by some 20%, or so) in Feulgen-dye content during metaphase with a subsequent decrease during anaphase (figure 1) cannot be claimed as real, although it is statistically significant. In these cases field sizes had to be used for which the present optical set-up definitely did not give a uniform illumination. It is, hence, hardly surprising that the DNA-values of the first two anaphases should agree well with each other but only poorly with most other values, as their chromosome distributions are similar to each other but quite different from those of all other nuclei in figure 1. The metaphase value 24.3 is the least reliable of all as the difference between the replications was unusually large (M 1 in figure 2). In the preliminary measurements a somewhat smaller value had been found for the metaphase than for the prophase, both having been measured under optical conditions not strictly comparable to those of the main series. At present it can only be concluded that there are no really large



changes in the DNA content during metaphase and anaphase; whether there are any (and they would be only, or mainly, temporary changes) must be left open until further measurements have been made with a truly uniform field illumination and phototube response.

The interphase, prophase and telophase nuclei were much less exposed to non-uniformity of the illumination or phototube response as their stained masses were always arranged around the center of a relatively small field. The mean DNA-content of the interphase nuclei (which had been selected for large size) happens to be practically identical with that of the prophase nuclei (table 1) and twice that of the six telophase

Table 1.

Stage	Number of Nuclei	Mean DNA-content $\bar{y}$	Mean square deviation $s^2(y)$	Standard error of mean $s(\bar{y})$
Interphase III . . . . .	4	18.8	0.7770 (10 d. f.)	0.44 or 2.3%
Prophase . . . . .	4	18.9		
Telophase (both daughter nuclei)	3	18.6		

nuclei ( $\gamma=9.3$ ). The three telophase totals display about the same variation as the interphase and prophase values. The three stages can, therefore, be pooled to give a common mean square deviation from which to compute the standard errors of the three means (table 1). In spite of the small sample sizes, it can be concluded that if there should be any difference in the DNA-content per set of chromatids between the three stages, it could not amount to more than a few percent. The results agree well with the expectation that in onion, as in *Rhoeo* and in *Tradescantia*, the largest interphase nuclei in the root meristem have already completed their DNA synthesis. The only appreciable change in the DNA content per nucleus that results from a mitosis is the halving which is caused by the distribution of the chromatids into two daughter nuclei.

The pooled  $\gamma$  values from interphase, prophase and telophase have a standard deviation of only 4.7%, derived from the estimate of variance  $s^2(\gamma)=0.7770$  (10 d. f.). The upper fiducial limit ( $P=0.05$ ) for the variance  $\sigma^2(\gamma)$  is 1.974. Let  $\sigma_1^2(\gamma)$  be that part of  $\sigma^2(\gamma)$  which is due to the noise that causes the variation between replications per nucleus. Estimates  $s_1(\gamma)$  of  $\sigma_1(\gamma)$  have already been given for each nucleus or mitosis (figure 2). A combined estimate of  $\sigma_1^2(\gamma)$  from our sample of 11 is  $s_1^2(\gamma)=0.1827$  (11 d. f.), namely half of the mean sum of squares from the 11 pairs of replications.

The remaining variation,  $\sigma_2^2(\gamma)=\sigma^2(\gamma)-\sigma_1^2(\gamma)$ , comprises (i) optical errors which are influenced by properties of the measured object (effects

of a non-uniform illumination or phototube response, distributional and other small errors, as discussed by PATAU 1952); (ii) a conceivable proportionality error (see the discussion); (iii) a natural variation in DNA content between nuclei, if this should exist. As an estimate of  $\sigma_2^2(\gamma)$  we have  $s_2^2(\gamma) = 0.7770 - 0.1827 = 0.5943$ , which yields an estimated coefficient of variation of only 4.1%. This could easily be caused entirely by optical errors, in particular by those due to non-uniformity of the illumination. As an upper fiducial limit of  $\sigma_2^2(\gamma)$   $1.974 - 0.102 = 1.872$  may be used, which leads to 7.3% as upper fiducial limit for the coefficient of variation. Since optical errors cannot possibly have been absent, it appears virtually certain that a natural DNA variation between nuclei, if such existed, had (in this material) a coefficient of variation of less, and most likely much less, than 7.3%.

#### IV. Discussion.

##### *A. Methodological aspects.*

The present measurements demonstrate the new method as a remarkably powerful tool, though the optical imperfections of the improvised set-up were bound to affect, in particular, the measurements at metaphase and middle anaphase. Even so, their accuracy is adequate for deciding whether the DNA content of a metaphase or anaphase falls into, say, the 2C or 4C class. With the conventional method these stages could not be measured at all, except in organisms with extremely compact mitotic plates.

If the conventional method were applied to our prophase nuclei the distributional errors would unquestionably be very considerable. They might also be quite large in the early telophase nuclei, because of their high optical density. This in conjunction with their relatively small size might further invite an appreciable stray light error. Even the interphase nuclei would be none too favorable for the old method as the nucleoli impose disturbing irregularities. The obtained coefficient of variation of 4.7% (or 4.1%, if allowance is made for the variation between replications per nucleus) is definitely much below any which could be hoped for if the same nuclei were measured by the conventional method; in fact, it is well below the coefficients of variation which are found in the great majority of published measurements of technically far more favorable samples of Feulgen-stained nuclei. Even so, it must be stressed that the here recorded coefficient of variation does in no way do justice to the accuracy which can confidently be expected from the two-wavelength method with practically any material if an instrument is employed which fulfills the two uniformity conditions (cf. PATAU 1952).

A satisfactory illumination can be achieved in two ways. If the entrance slit of the monochromator is uniformly illuminated we may project an image of the exit slit into the plane of the object. This would still leave a wavelength gradient across the field, and it also would not permit adjustment of the size of the illuminated field close to that of the measured field. Both shortcomings (which are of importance only if the highest accuracy is desired) can be avoided by using the KOEHLER-principle with the exit slit of the monochromator serving as light source. If the image of this slit, as projected on the microscope condenser by a lens  $L$ , is made just large enough to fill the utilized condenser aperture, the image of  $L$  (or, rather, of its utilized part) in the plane of the object will represent the largest uniformly illuminated circular field that is possible with a given slit width (e. g. corresponding to  $\Delta\lambda = 1 \text{ m}\mu^1$  and a given numerical aperture of the condenser (recommended: N. A. = 0.3—cf. PATAU 1952<sup>2</sup>). It can easily be shown that the thus determined maximum diameter of a circular field is the same as that which could be obtained if the exit slit were projected into the plane of the object. This maximum diameter is proportional to the product (smallest diameter of the effective prism aperture)  $\times$  (angular dispersion of the prism). With the equivalent of two fair sized  $60^\circ$  glass prisms (as in the Perkin-Elmer Universal Monochromator) this product is large enough to permit a field diameter of  $30 \mu$  with  $\Delta\lambda = 1 \text{ m}\mu$  (at  $\lambda = 510 \text{ m}\mu$ ) and N. A. = 0.3. If a monochromator is employed in which that product is smaller, such a field diameter can be achieved only by increasing  $\Delta\lambda$  (that is, by sacrificing part of the monochromasy) or by decreasing the N. A. of the microscope condenser below 0.3 which would not generally be advisable.

For purposes which require merely a modest accuracy (which would still be excellent by previous standards) almost any monochromator would do, if a lens in front of the exit slit is added for the KOEHLER-illumination. The same equipment would also make possible extremely accurate work as long as only small objects are to be measured, provided, of course, that the image formation within the monochromator is good enough to allow a sufficient spectral purity (a monochromator with a spherical collimating mirror may, on this account, be unsatisfactory for very accurate work). Heterochromatic stray light can be guarded against by suitable filters. A more expensive monochromator will be

<sup>1</sup> If both the entrance and the exit slit have this width, the band width would actually be  $2 \text{ m}\mu$  but with 85% of the light belonging to a band of  $1 \text{ m}\mu$  width (taking into account that the utilized part of the slit image is circular).

<sup>2</sup> Under these circumstances the intensity of the illumination depends only on  $\Delta\lambda$ . In this respect all prism monochromators are equivalent, apart from such light losses as are determined by the number of optical surfaces. Grating monochromators are counter-indicated for our purposes as they inevitably yield a lower intensity.

required only if relatively large objects, such as squashed onion mitoses, are to be measured with maximum accuracy.

The maximum accuracy in the sense of minimized optical errors need not always be matched by a particularly high accuracy of the photometric readings in regard to random fluctuations ("noise"). If means obtained from structurally different nuclei are to be compared with each other the averaging may sufficiently reduce the reading errors but not necessarily the optical errors which are apt to affect different sample means to a different degree. For a comparison of sample means the usual type of one beam photometer is adequate if precautions are taken against errors arising from the non-uniformity of the photo-sensitive layer (cf. PATAU 1952, p. 359, footnote 2). Repeated measurements of the same nucleus would not be necessary (counting two quadruples of readings as one measurement). In our pooled interphase, prophase and telophase values the reading accuracy, expressed as the mean sum of squares between replications per nucleus, was  $2 s_1^2(\gamma) = 0.3654$  (see p. 155). On this basis, single measurements of only ten nuclei would be sufficient to reduce the effect of noise on the mean to a coefficient of variation of about 1%.

If, however, an upper limit for the natural variation in DNA-content between nuclei of one sample is to be estimated, at least two replications per nucleus should be considered a must. Only thus can we eliminate at least that part of the non-biological variation between measured values which is caused by random inaccuracies of the readings. If a very high accuracy of DNA-values were required for each of numerous nuclei the noise level of a single beam photometer might necessitate an impractically high number of replications. In that case a double beam arrangement, such as described by CASPERSSON (1950), would become essential. This, of course, would be a time-saving asset under any circumstances.

#### *B. DNA-content and the mitotic cycle.*

Previous investigations on the DNA-content of nuclei have failed to give an entirely consistent picture. There is, however, a consensus of opinion that the nuclei of any organism tend to fall into classes characterized by mean DNA-contents which are approximately integer multiples of a certain amount,  $C$ . It is also generally agreed upon that these multiples, usually terms of the series  $C$ ,  $2C$ ,  $4C$ , ..., show a close relation to the chromosome, or rather the chromatid, number.  $C$  is apparently always found immediately after the second meiotic division. In embryonic tissue, such as a root meristem, in which all nuclear stages continue to display about the same appearance throughout numerous mitotic cycles each of these must involve a doubling of the DNA-content as well as a gene reproduction. There is no real proof yet that this DNA-

synthesis represents, or is part of the gene reproduction, or even that the two processes coincide. On general grounds, however, we may expect DNA-synthesis and gene reproduction, if they should be different processes, to be at least closely related.

The period of DNA synthesis in the meristem of plant roots has been established by two quite different methods. Using autoradiographs PELC and HOWARD (1952, etc.) could show that in *Vicia* the DNA-synthesis, as indicated by the uptake of  $P^{32}$ , occurs only at interphase and ends six to eight hours before the visible onset of prophase. This agrees with results obtained by photometric measurements of Feulgen-stained nuclei. The relative frequencies of 2C, intermediate, and 4C values in the meristem of corn and *Tradescantia* (SWIFT 1950, b) showed the DNA synthesis to precede prophase. More detailed information was obtained by correlating DNA values with nuclear volume: PATAU (1952) found in *Rhoeo* that within single meristematic cell rows the nuclear volume can be used as a crude time scale (which, of course, is non-linear owing to a decreasing growth rate). Smaller, i. e., younger, interphase nuclei have, at least approximately, the 2C amount of DNA. The subsequent period of DNA-synthesis is revealed by significantly intermediate DNA-values which show an increase with nuclear volume, i. e., with time. The largest, i. e., oldest, interphase nuclei belong to the 4C class. This was confirmed by SWIFT (1953) in *Tradescantia* when plotting the DNA values of meristematic interphase nuclei against nuclear volume (in this case it was not necessary to do this separately for individual cell rows, as there is much less size variation in *Tradescantia* than in *Rhoeo*). The present results show that essentially the same situation exists also in the onion meristem. The four interphase nuclei had been selected for their size and they all proved to be clearly 4C. All telophase nuclei were 2C and the appearance of small interphase nuclei made it evident, even without measurements, that no major change in DNA content had taken place yet.

In view of these results the following phases may be distinguished: interphase-I with, in diploid tissue, the DNA-content 2C; interphase-II, the period of DNA-synthesis (which, in *Rhoeo*, seems to last several hours); interphase-III with the DNA-content 4C. It might be objected that the last phase could as well be regarded as the first period of prophase but this does not appear advisable for the following reasons (PATAU 1952, and unpublished observations): (i) In roots of *Rhoeo*, cells may enter the nondividing elongation period with their nuclei either at interphase-I or at interphase-III. Consequently both 2C and 4C nuclei are found in the elongation zone of the root (though in very different proportions in anatomically different cell rows) but there are apparently no nuclei with significantly intermediate DNA-values. The 2C and 4C

nuclei seem to have, apart from differences in volume and stainability, very much the same structure, whether observed in the meristem or in the elongation zone. To call 4C nuclei in this zone "arrested prophase" would not only violate the original morphogenetic character of the prophase concept but might even be misleading. For all we know, a 4C nucleus in the elongation zone may or may not be a tetraploid interphase-I in the sense that it would require another DNA-synthesis before it could undergo a normal mitosis. It seems reasonable to interpret the DNA-content as being proportional to the number of chromosome strands. DNA-measurements alone cannot, however, distinguish between a diploid interphase-III and a tetraploid interphase-I, between a tetraploid interphase-III and an octoploid interphase-I, etc.

(ii) Another reason for not calling an interphase-III a prophase is implied by the above mentioned conditions in the root of *Rhoeo*, and especially by the fact that certain cell rows in the elongation zone contain practically exclusively 2C, and other predominantly 4C nuclei. Since no such difference between cell rows exists in the meristem, it must be concluded that in cell rows of the first kind 4C nuclei had entered mitosis when the initiation of DNA-synthesis was already blocked in 2C cells, while in cell rows of the second kind the opposite is true: after the end of the mitotic period, DNA-synthesis had gone on until most nuclei had reached the 4C phase. Either process, once begun, is under normal circumstances apparently always completed. Obviously DNA-synthesis and the visible chromosomal changes which characterize mitosis are essentially independent processes, even though a normal mitosis presupposes a previous DNA doubling<sup>1</sup>.

Interphase, and possibly very early prophase, may perhaps, a priori, be regarded as the most likely period, or periods, for the DNA-synthesis. At this, or these, stages, the chromonema has presumably its largest free surface. However that may be, it certainly would be surprising if the DNA-doubling should occur at interphase in certain cases, such as plant roots, but in highly contracted chromosomes in others. One such case has been reported: PASTEELS and LISON (1950), found in rat crypts of Lieberkühn an approximate doubling of the DNA-values during late anaphase and early telophase. These data are open to methodological doubts: late anaphase nuclei in rat are small and very densely stained. Both these circumstances make for a rather large stray light error (PATAU and BLOCH, unpublished) which should sharply decline when,

<sup>1</sup> GETTLER (1943) observed in three plants of *Paris* postmeiotic mitoses of nuclei with yet undivided chromosomes. In these otherwise normal mitoses the metaphase passed directly into telophase. If the undivided state of the chromosomes could be taken to indicate that no DNA-doubling had occurred, this case would further underline the essential independence of the two processes.



with advancing telophase, the nuclei become larger and optically less dense. The distributional error, never quite negligible in measurements of dense nuclei by the conventional method, would simultaneously decrease. Both errors lead to underestimates of the dye-content and could very easily simulate a considerable increase of the DNA-content during a period of nuclear growth. The most effective way of decreasing both errors is to use a wave length at which the absorption is much smaller than at the peak of the Feulgen absorption curve. Taking this precaution, ALFERT and SWIFT (1953) obtained in rat crypts of Lieberkühn the following DNA-values: anaphase: 16.5; early telophase: 17.0; mid telophase: 17.5; late telophase and early interphase: 16.6.

SWIFT (1950, a) observed many intermediate DNA-values in interphase nuclei of mitotically active embryonic mouse liver, but well separated DNA classes in mature liver. PATAU and BLOCH (unpublished), fully confirmed this. They, furthermore, correlated the DNA-values with nuclear volume. Within DNA classes in mature liver no such correlation was found, while in the mitotically active liver of embryonic and new-born mice the numerous intermediate DNA-values showed a positive regression on volume. Again, as in the root meristem of plants, the nuclear volume can serve as a crude time scale. Both this regression and the relatively high frequency of intermediates indicate that DNA-doubling requires appreciable time.

It is noteworthy that evidence for DNA-synthesis during interphase has been found not only in higher plants and animals but also in Protozoa. In certain *Radiolaria* (*Collozoa*) the stable nuclear state is, morphologically, a late telophase (PATAU 1937). The interphase is relatively very short. Recognizable prophase nuclei are always much darker stained (Feulgen) than the telophase nuclei. All these nuclei are of very similar size and densely packed with chromosomes. Experience has, since, shown that under these conditions the existence of DNA-classes can be judged reliably without actual measurements. The first author has no doubt that his old observations demonstrate that DNA-doubling occurs after late telophase and before, or during the very first part of prophase. SECHACHAR (1950) found older interphase micronuclei of the ciliate *Chilodonella* to have twice the DNA-content of recently divided nuclei. It seems that the relative durations of interphase-I, -II, and -III may be very different in different organisms. Perhaps-I and -III, or both, may even be missing in certain cases.

DNA-synthesis during leptotene was found by SWIFT (1950, b) in *Tradescantia*. RIS (1947) reported a DNA-increase during the prophase of onion root cells and grasshopper spermatocytes. Dr. RIS has informed us that, in view of recent work of other workers, he now considers this increase as not real.

The independence of DNA-synthesis and the onset of mitosis is also borne out by experimental evidence. According to DUNCAN and WOODS (1953) immersion of *Allium* roots in 5-aminouracil blocks DNA-doubling, but not mitosis of such nuclei as have already undergone doubling. Benzimidazole blocks both processes. It may, perhaps, be anticipated that amongst the many known agents causing "preprophase inhibition of mitosis" (D'AMATO 1950, *et al.*) one or more will be found that inhibits the onset of prophase but not DNA-synthesis. It is not entirely clear how the results of DNA-measurements are related to the extensive work by BULLOUGH (1952, etc.) and others on "the energy relations of mitotic activity". In BULLOUGH's words: "the antephasis may therefore be tentatively defined as that period immediately preceding the prophase when an energy store is created. It ends as the prophase begins, but its length is unknown". Is this energy store needed for mitosis itself or for DNA-synthesis (chromosome reproduction) or for both? BULLOUGH and JOHNSON (1951) found that in mouse epidermis the point of inhibition of mitosis (by "withdrawal of glucose, the imposition of anaerobic conditions, or the addition of inhibitors of glycolysis or respiration") is apparently "only some minutes before the visible prophase". This seems to rule out that primarily only DNA-synthesis had been interfered with but it does not rule out that a sizeable energy store may also be necessary for DNA synthesis.

#### *C. Constancy of the DNA content.*

The above discussion of DNA-synthesis as part of the mitotic cycle did not touch upon the questions whether that synthesis represents a precise doubling and whether, outside of the period of doubling, the DNA content per chromosome is strictly constant. It is, of course, entirely possible that, alternatively, there is merely an optimum amount of DNA which is only approximately maintained and which may not even be quite the same at different times or in different types of cells. The only operationally meaningful question at present is whether such variation has already been proven.

The question needs qualification. Nobody would expect the same DNA content in nuclei which do not have the same chromosome complement. Mitosis, as any complex biological process, is apt to be occasionally less than perfectly regular with the result that aneuploid nuclei are formed. Experience has shown that aneuploid chromosome numbers, apart from such rather special cases as B chromosomes, are rare in actively dividing tissues of organisms (e. g. onion) which facilitate reliable chromosome counts by a small or medium chromosome number. The degree of regularity may be lower in organisms with many chromosomes, in particular if these are crowded. Not only may here a regular anaphase

separation be more difficult but the selectional pressure against irregularities is likely to be smaller. The physiological disadvantages of, say, a missing chromosome should, on the average, be the smaller the larger the chromosome number. It is now recognized that the degree of mitotic regularity had, in the past, been overestimated and that the, doubtless often justified, scepticism of cytologists to reports of variable chromosome numbers in such difficult objects as birds and mammals had been carried too far. Correspondingly, a considerable internuclear DNA-variation may occur in many organisms, even if the amount of DNA per chromosome is strictly constant.

A different kind of irregularity would arise if in the course of developing polysomaty the strands in one nucleus should fail to double simultaneously (HUSKINS and STEINITZ 1948, a). There is no proof yet of this occurring with an appreciable frequency. HUSKINS and STEINITZ (1948, b) found amongst many indole acetic induced mitoses in differentiated root tissue of *Rhoeo* only two in which the total number of strands was not equal to the haploid number multiplied by a power of two. PATAU (1952) found no significantly intermediate DNA-values in the elongation zone of *Rhoeo* roots: apart from a very few 8C nuclei, only 2C and 4C nuclei were encountered. However, the possibility of some internuclear DNA-variation due to irregular strand reproduction has to be acknowledged. The same holds true for the consequences of chromosome breaks.

The frequency of nuclear irregularities of one or the other kind in different organisms and tissues could so far be estimated only by means of counts of chromosomes and chromosome strands. If the DNA-content per strand should turn out to be constant or nearly constant, sufficiently accurate DNA-determinations would, of course, furnish an excellent method of making unbiased surveys of nuclear irregularities in any kind of tissue. At present, microphotometric results on inter-nuclear DNA-variation that are not complemented by direct observations on chromosomes are likely to be ambiguous. They could as yet be interpreted as demonstrating aneuploidy only if closely agreeing DNA-values were found in most nuclei but strikingly different DNA-values in a few exceptional ones. A natural DNA-variation around an optimal amount per euploid nucleus surely would be continuous and would presumably have a fairly normal distribution. Therefore, a statistically significant heterogeneity of a sample of DNA-values could be considered evidence of aneuploidy or other irregularities of the chromosome complement. The possibility that, apart from variation caused by nuclear irregularities, there is also some genuine variation of the DNA-content per chromosome strand has, as far as the authors are aware, never been denied by anybody. We feel, however, that at present this is no more than a possibility and

that the following working hypothesis is still tenable. It is proposed solely because it offers the possibility of experimental refutation if it should be false.

*Working hypothesis.* Any genome has a constant amount,  $C$ , of DNA. This amount is precisely doubled in the course of any complete genome reproduction (that is one which leads to a doubling of all chromosome strands<sup>1</sup>). Consequently, short of chromosome breaks, asynchronic strand reproduction, and mitotic irregularities, all nuclei of an organism which are not in a period of DNA-doubling have DNA-contents that are integer multiples of  $C$ <sup>2</sup>.

This hypothesis, of course, contradicts the ideas that have been advanced by DARLINGTON and LaCOUR (1940 *et seq.*) and others (including the first author) as to a relation between a variable "DNA-charge" and morphological changes of chromosomes. Since no relevant DNA-measurements existed at the time, such ideas were wholly speculative. It is quite impossible to estimate reliably by mere inspection the relative amounts of Feulgen-dye in nuclei of very different structure or in chromosomes of different degrees of contraction. With the new photometric method these earlier speculations on "DNA-metabolism" can now be tested. The present results do not support them. At least up to the end of prophase and during telophase there is certainly no DNA-change of the magnitude implied in those speculations (cf. also ALFERT 1950).

More serious is the apparent contradiction between the working hypothesis of constancy and a number of results obtained by various workers with the conventional microphotometric method. Unfortunately some of these results are at variance with those obtained by other authors. We do not propose to enter a discussion of the merits of the various published data (for that see SWIFT 1953) but rather to examine the methodological problems involved in any attempt to disprove constancy. These are formidable. Apparent contradictions to the working hypothesis can be of two kinds: (i) indications of a DNA-variation within a presumably homogeneous sample of nuclei which are not undergoing DNA-doubling; (ii) mean DNA-values of several such samples that cannot be considered as representing plausible integer multiples of one suitably chosen amount  $C$ . Let us assume that in either case the observed deviation from constancy is statistically significant<sup>3</sup> and that it cannot

<sup>1</sup> In this context it is irrelevant how many visible, or submicroscopic strands, say, an anaphase chromosome may have.

<sup>2</sup> The working hypothesis may also be formulated for individual chromosomes. It appears quite unlikely that the nucleus could maintain a strict constancy of the total DNA content, if this were not based on constancy per chromosome.

<sup>3</sup> In case (i) this requires at least two replications per nucleus in order to eliminate that part of the variation which merely reflects photometric noise (cf. p. 161).

be interpreted as a result of mitotic or other irregularities. Especially in case (i) the possibility of aneuploidy should not be dismissed without good reason.

Next arises the question to what extent the differences can be ascribed to optical errors. With the conventional microphotometric method, in particular if used at the peak of the Feulgen absorption curve and with densely stained and rather heterogeneous nuclei, this question in many cases simply cannot be answered with any assurance. Consider, for instance, a sample of 4C nuclei as compared with other samples. Let the distributional error in the case of these 4C nuclei be 8%, and the stray light error 4.5% higher than in the other samples (such and considerably larger differences in optical errors may have occurred quite frequently). Both errors would combine to bring the measured value down right into the middle between the 4C and the 3C class. In case (i) optical errors cannot be ruled out merely because the nuclei are of similar structure. If the measurements involve high extinctions, these errors may vary greatly with nuclear size (see p. 15). But let us assume that the optical errors are demonstrably too small to account for a discrepancy between the obtained values and the working hypothesis. We would still have to ask whether the measured dye-contents of nuclei were proportional to the DNA-content or, in other words, whether the results were sufficiently free of a "proportionality error" (PATAU 1952). On that point there is no real assurance in any of those data published to date which seem to fall under case (ii).

It is known that very competent workers have been reluctant to evaluate the Feulgen reaction quantitatively because of well-founded doubts about its quantitative character. It has, since, been fairly generally accepted that the reaction is in many cases sufficiently quantitative to make Feulgen microphotometry a useful method. That it can give approximately correct relative values was demonstrated by RIS and MIRSKY's (1949) comparison of microphotometric determinations with biochemical extraction data. Such comparisons have, however, a limited accuracy and can, furthermore, hardly be extended to a sufficient variety of objects and fixatives to warrant the conclusion that the proportionality error is generally negligible. The strongest basis for our confidence in the reliability of the microphotometric method consists in those numerous cases in which the mean dye-contents of various samples of nuclei come so very close to simple numerical relations that the agreement could not possibly be ascribed to a mere chance accumulation of errors. Neither can these relations be explained by unconscious bias. Every value is, with the conventional method, based on at least two photometric readings and one geometrical measurement. Only a deliberate selection

among the values computed from these variates could force class means to agree with preconceived notions.

Simple numerical relationships in a sufficiently large number of data are, therefore, inherent evidence of reliability. As it happens, the simple relations that have been found agree with our working hypothesis. Those published data which seem to contradict it lack at the same time that inherent evidence of reliability. Short of consistent agreement with simple numerical relations there is, as yet, no real basis for claiming that the measured dye-contents are sufficiently proportional to the DNA-contents. It should immediately be stressed that to suggest the possibility of appreciable proportionality errors is in no way meant to cast doubts on the quality of other authors' work. If such errors should sometimes be large enough to be misleading, our present ignorance as to their causation would leave their occurrence largely to chance. The point to be made is that a disproof of the working hypothesis, if it should be false, would require more information on the proportionality error than we have so far. Up to now it has been demonstrated only that this error is small in many cases.

A complete analysis of the proportionality error would be exceedingly difficult. Since BAUER's (1932) study of the effect of 24 fixatives on the Feulgen reaction, it is known that the regression curve of Feulgen-dye on the duration of hydrolysis depends greatly on the fixative. The general shape of such curves was interpreted by BAUER as demonstrating two processes: first, a progressive liberation of purine bases making for an increasingly dense staining and then some kind of destructive process causing a decreasing stainability. More specific information about these processes was given by HILLARY (1939) and DiSTEFANO (1948). It would, *a priori*, appear likely that the speed of either process is influenced to some extent by the accessibility of the DNA to the fixative and to the various steps of the Feulgen procedure. In this respect there may be an appreciable difference between the DNA in the interior of thick metaphase chromosomes and that in highly dispersed interphase chromosomes. The accessibility of the nucleus to the fixative might also be of some concern. Indeed, SWIFT (1953) found that the amount of Feulgen dye in nuclei near the surface of blocks of rat tissue fixed in 10% formalin was somewhat higher than in nuclei from the center. Different permeability of the cell wall in different tissues of a plant may conceivably affect not only the fixation but also the Feulgen reaction, even if this is performed with microtome sections. The presence of "stain inhibitors", such as tannins in plant epidermal cells, may further complicate matters (MILOVIDOV 1936, HILLARY 1939). We may perhaps hope that proportionality errors would betray themselves by changed dye-proportions,



if we tried various fixatives, times of hydrolysis, and different hydrolysing agents. It has been recommended to replace hydrochloric acid by perchloric acid (DiSTEFANO 1952) or by phosphoric acid (HASHIM 1953). If it should not always be possible to reduce proportionality errors to insignificance by such means, stringent tests of the working hypothesis may have to be limited to methodologically favourable material. As such, smears of animal tissue with small nuclei and thin chromosomes would probably qualify best.

The present data on the DNA-content of interphase, prophase and telophase nuclei are in excellent agreement with the working hypothesis of constancy. The data on metaphase and anaphase are in no way conclusive. Suppose, however, that future measurements on the same slides should reveal a somewhat higher dye content at metaphase than at the other stages. For the above reasons, this would not yet disprove DNA constancy but rather call for an investigation of the methodological aspect. By the same token we conclude that as yet no data have been published that seriously contradict the working hypothesis which, after all, refers to DNA and not to Feulgen dye.

*Added to proof:* Recent extensive measurements on mitotic nuclei in sections of onion root by PATAU and SRINIVASACHAR (unpublished) fully confirm the results reported here. Both for prophase nuclei and for metaphases a corrected coefficient of variation of 5.5% was found, which seems to be within the limits of errors due to non-specific absorption. In variously prepared slides proportionality errors affecting somewhat the relative dye contents of different stages were indicated. However, the over-all mean of the metaphase dye-content was 100.2% and mid-anaphase 105.5% that of prophase nuclei from the same slides.

### Summary.

The microphotometric two-wavelength method is demonstrated to permit, even with only an improvised optical set-up, DNA-measurements which would not be possible, at any rate not with a comparable accuracy, with the conventional method.

The data, in agreement with earlier results, show that the largest interphase nuclei in the root meristem have already completed their DNA-synthesis.

The mean DNA-contents per set of chromatids at late interphase, prophase, and telophase, appeared to be virtually identical. A natural variation in DNA-content, if any, between individual nuclei at these stages would have a coefficient of variation of significantly less, and most likely much less, than 7.3%. The data from metaphase to middle

anaphase are, for technical reasons, not yet conclusive. An indicated, moderate, excess of Feulgen-dye in these as compared with earlier and later stages may not be real.

The results are fully compatible with a working hypothesis of strict constancy of the DNA-content per chromatid and of its precise doubling during DNA-synthesis (for necessary qualifications see the discussion). It is pointed out that apparently contradictory results by certain other authors do not, for methodological reasons, yet establish disproof of this hypothesis.

### Literature.

- ALFERT, M.: A cytochemical study of oogenesis and cleavage in the mouse. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **36**, 381—406 (1950). — ALFERT, M., and H. SWIFT: Nuclear DNA constancy. *Exp. Cell Res.* **1953**. — BAUER, H.: Die Feulgensche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.* **15**, 225—247 (1932). — BULLOUGH, W. S.: The energy relations of mitotic activity. *Biol. Reviews* **27**, 133—168 (1952). — BULLOUGH, W. S., and M. JOHNSON: The energy relations of mitotic activity in adult mouse epidermis. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **138**, 562—575 (1951). — CASPERSSON, T.: Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Skand. Arch. Physiol.* **73**, Suppl. 8, 1—151 (1936). — A universal ultramicrospectrograph for the optical range. *Exper. Cell. Res.* **1**, 595—598 (1950). — D'AMATO, F.: The quantitative study of mitotic poisons by the *Allium cepa* test: data and problems. *Protoplasma* **39**, 423—433 (1950). — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. *J. Genet.* **40**, 185—213 (1940). — DiSTEFANO, H. S.: A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. *Chromosoma* **3**, 282—301 (1948). — Feulgen hydrolysis with perchloric acid. *Stain Technol.* **27**, 171—174 (1952). — DUNCAN, R. E., and P. S. WOODS: Some cytological aspects of antagonism in synthesis of nucleic acid. *Chromosoma* **6**, 45—60 (1953). — GEITLER, L.: Über eine post-meiotische Teilungsanomalie und den Spiralbau der Chromosomen von *Paris quadrifolia*. *Chromosoma* **2**, 519—530 (1943). — HASHIM, S. A.: Feulgen hydrolysis with phosphoric acid. *Stain Technol.* **28**, 27—31 (1953). — HILLARY, B. B.: Use of the Feulgen reaction in cytology. I. Effect of fixatives on the reaction. *Bot. Gaz.* **101**, 276—300 (1939). — HUSKINS, C. L., and L. M. STEINITZ: The nucleus in differentiation and development. I. Heterochromatic bodies in energetic nuclei of *Rhoeo* roots. *J. Hered.* **39**, 35—43 (1948a). — The nucleus in differentiation and development. II. Induced mitoses in differentiated tissues of *Rhoeo* roots. *J. Hered.* **39**, 67—77 (1948b). — MILOVIDOV, P. F.: Zur Theorie und Technik der Nuklealfärbung. *Protoplasma* **25**, 570—597 (1936). — ORNSTEIN, L.: The distributional error in microspectrophotometry. *Labor. Invest.* **1**, 250—262 (1952). — PASTEELS, J., et L. LISON: Recherches histophotométriques sur la teneur en acide désoxyribosenucléique au cours de mitoses somatiques. *Archives de Biol.* **61**, 445—474 (1950). — PATAU, K.: Partielle heterochromatische Chromosomen bei Radiolarien. *Arch. Protistenkunde* **89**, 393—404 (1937). — The DNA content of nuclei in root tips of *Rhoeo discolor*. *Rec. Gen. Soc. Amer.* **21**, 56 (1952a). — Absorption microphotometry of irregular-shaped objects. *Chromosoma* **5**, 341—362 (1952b). — PELC, S. R., and A. HOWARD: Techniques of autoradiography and the application of the stripping-film method to problems of nuclear metabolism. *Brit. Med. Bull.* **8**, 132—135 (1952). — PERSIDSKY, M. D.: A vibratory microtome for sectioning living

tissue. *J. Labor. a. Clin. Med.* **1953**. — RIS, H.: The composition of chromosomes during mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 158—160 (1947). — RIS, H., and A. E. MIRSKEY: Quantitative cytochemical determination of deoxyribonucleic acid with the Feulgen nuclear reaction. *J. Gen. Physiol.* **33**, 125—145 (1949). — SESHACHAR, B. R.: Desoxyribonucleic acid content of the Ciliate micronucleus. *Nature* **165**, 848 (1950). — SWIFT, H.: The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. *Physiologic. Zool.* **23**, 169—198 (1950a). — The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **36**, 643—654 (1950b). — Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Internat. Rev. of Cytology* **2**, 1—76 (1953).

Dr. K. PATAU, Dept. of Botany, University of Wisconsin,  
Madison 6, Wisc., U.S.A.

Dr. H. SWIFT, Whitman Laboratory, University of Chicago,  
Chicago 37, Ill., U.S.A.

Du Laboratoire de Zoologie de l'Université de Rennes.

## CARTE CYTOLOGIQUE DES CHROMOSOMES GÉANTS DES GLANDES SALIVAIRES DE DROSOPHILA IMMIGRANS STURT.

Par

JEAN LE CALVEZ.

Avec 1 figure dans le texte et une planche.

(Eingegangen am 25. Juli 1953.)

### I. Origine du matériel et méthodes.

La souche utilisée comme standard dans cette étude provient du Département de Génétique de l'Université du Texas. Elle est entretenue dans le laboratoire du Prof. PATTERSON sous le n° 1516—11. Des comparaisons avec les souches «Belluno» et «Pallanza» reçues d'Italie du Prof. BUZZATI-TRAVERSO montrent une parfaite identité structurale.

Les configurations représentées résultent de la synthèse de cinq secteurs homologues choisis en extension moyenne dans différentes préparations. Une telle carte n'a pas la prétention d'être définitive; il est probable que des bandes à faible définition ont échappé à l'analyse. Malgré son imperfection, cette carte pourra permettre aux généticiens expérimentant sur cette espèce, de trouver quelques repères chromosomiaux.

### II. Le caryotype somatique.

Il semble utile, pour la compréhension caryologique de cette espèce, de rappeler son caryotype somatique, étudié dans les grands neuroblastes des ganglions cérébroïdes des larves, et déjà publié (LE CALVEZ 1949).

Les métaphases, en contraction maxima, révèlent l'existence chez les femelles, de l'assortiment chromosomal suivant: une paire de métacentriques à bras sub-égaux et trois paires de télocentriques (Fig. 1a). La paire la plus longue s'identifie avec la paire hétérochromosomiale, car chez le mâle, l'un des partenaires est remplacé par un Y, métacentrique, à bras très inégaux (le court ayant approximativement le tiers de la longueur du long).

Les prométaphases sont plus instructives quant à la forme et à la structure des éléments; elles permettent d'apprécier la longueur des portions euchromatiques. A ce propos, une distinction a été faite (LE CALVEZ, loc. cit.) entre hétérochromatine primaire compacte, dérivant directement de la dislocation du chromocentre du noyau entrant en

prophase, et hétérochromatine secondaire, structurée, apparaissant plus tardivement comme une accélération des processus de nucléination dans les régions proximales de certains chromosomes prométaphasiques. Dans la représentation semi-schématique de ces rapports entre euchromatine et hétérochromatine (Fig. 1b), deux particularités sont mises en évidence:

a) La longueur de la paire 2, totalement euchromatique et approximativement double de celle des autres secteurs euchromatiques.

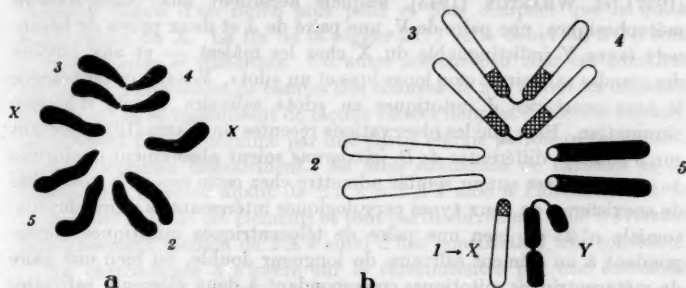


Fig. 1a u. b. *Drosophila immigrans*. a Plaque équatoriale femelle (grand neuroblaste). Acetocarmine.-Gross.: 3.000. b Caryotype schématique mâle interprété d'après les renseignements prométaphasiques. Désignation numérique des éléments. Euchromatine en blanc, hétérochromatine «primaire» en noir, hétérochromatine «secondaire» en hachures.

b) Les éléments de la paire 5 sont constitués par un minuscule secteur euchromatique proximal suivi d'une très longue portion d'hétérochromatine à pycnose précoce (hétérochromatine primaire).

La connaissance de ces deux faits permet d'établir avec certitude les homologies entre chromosomes des noyaux somatiques banaux et éléments des noyaux salivaires.

### III. Les noyaux des glandes salivaires.

Un bref aperçu en a été donné (LE CALVEZ, loc. cit.). Au chromocentre sont associés quatre grands éléments (dont trois sub-égaux et un de longueur approximativement double), et un «dot». Le X se repère préalablement chez les mâles, où cet élément est haploïde. Le plus long élément se détache facilement du chromocentre; de par ses dimensions, on doit évidemment l'homologuer à la grande paire euchromatique des prométaphases somatiques. Les deux autres éléments restant souvent associés par leur extrémité proximale s'identifient avec les branches de la paire métacentrique, compte tenu de leurs longueurs relatives. Quant au «dot», souvent enfoui dans le chromocentre, il représente la minuscule portion proximale euchromatique de la paire de télacentriques mitotiques presque totalement hétérochromatiques.

Voici les désignations et les longueurs moyennes de ces éléments salivaires:

- 1 = hétérochromosome X: 170  $\mu$
- 2 = le plus long: 310  $\mu$
- 3 = la plus longue branche des V mitotiques: 190  $\mu$
- 4 = la plus petite branche des V mitotiques: 150  $\mu$
- 5 = le «dot»: 8  $\mu$

Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux publiés par EMMENS (1937) et WHARTON (1943), lesquels accordent aux configurations métaphasiques: une paire de V, une paire de J et deux paires de bâtonnets (avec Y indistinguable du X chez les mâles), — et aux noyaux des glandes salivaires: cinq longs bras et un «dot». WHARTON homologue le bras court des J mitotiques au «dot» salivaire enrichi d'hétérochromatine. Bien que les observations récentes de WARD (1949) portant sur 9 souches différentes de *D. immigrans* soient absolument conformes aux miennes, cet auteur semble admettre chez cette espèce la possibilité de coexistence de deux types caryologiques intéressant la paire chromosomiale n° 2: ou bien une paire de télocentriques mitotiques correspondant à un élément salivaire de longueur double, ou bien une paire de métacentriques mitotiques correspondant à deux éléments salivaires de longueur normale. Cette dernière possibilité (configuration WHARTON) m'est suspecte, et cela pour deux raisons. La première est la grande flexibilité dans les prométaphases somatiques des chromosomes de la longue paire n° 2. La seconde est la difficulté à obtenir intact un élément salivaire de 310  $\mu$  de longueur et de pouvoir le suivre de bout en bout. En fait il est souvent fragmenté dans les préparations et si l'extrémité distale se trouve placée dans le voisinage du chromocentre on peut être abusé et décompter deux éléments normaux au lieu d'un de longueur double.

#### IV. Caractéristiques principales des éléments salivaires.

Le système de désignation des bandes est celui instauré par PATTERSON, STONE et GRIFFEN (1940) pour *Drosophila virilis*: chaque élément est découpé en 8 sections de A à H, — la section H ne comprenant que l'hétérochromatine et le centromère, ou seulement le centromère si l'hétérochromatine proximale fait défaut. Chaque section est divisée à son tour en segments numérotés, de nombre inférieur à 10. La désignation des bandes à l'intérieur de ces segments se fait en utilisant l'ordre des lettres de l'alphabet: a, b, c, d, etc.

Le chromosome X est le plus facile à identifier grâce à l'énorme bulbe hyalin qu'il présente en 1 E 4. Son extrémité libre, un peu diffuse, épanouie en champignon ne peut se confondre avec aucune autre. L'extrémité attachée est claire dans sa partie hétérochromatique dont



l'importance varie sensiblement suivant les noyaux. On peut cependant considérer les deux capsules I G 5a et I G 5c comme de bons repères pour identifier la racine de ce X.

Le chromosome 2, lorsqu'il est intact, se distingue par ses dimensions: longueur double de celle des autres éléments. Sa racine, en forme de bourgeon, peu adhérente au chromocentre, se repère aisément grâce aux quatre bandes très colorées de 2 G 9. Vers son milieu on peut encore citer 2 E 4 comme structure caractéristique: une capsule à l'aisselle distale d'un bulbe plus petit et plus compact que le bulbe signalétique du X. La fin de la région 2 C 7 et le début de 2 C 6 sont souvent confus et distordus. Un autre secteur peu clair est constitué par les deux ensembles de bandes très colorées de 2 A 7 dont les éléments fusionnent et se vésiculisent de façons variées dans les différents noyaux. L'extrémité libre se termine par une partie élargie parfois rectangulaire, parfois déprimée latéralement. La série subdistale de capsules et de bandes très colorées allant de 2 A 2 à 2 A 4 aide à l'identification de l'extrémité libre de cet élément, et tout particulièrement celle traversant l'élargissement médian de 2 A 4 suivi d'une constriction très constante.

Le chromosome 3 s'insère sur le chromocentre par une extrémité arrondie. Non loin de là, en 3 G 5 on rencontre la configuration la plus caractéristique de cet élément: une large vésicule, toujours close même si le secteur est en extension forcée. Entre cette vésicule et l'extrémité proximale se placent plusieurs groupes de chromomères dont l'aspect varie sensiblement d'un noyau à l'autre par suite du voisinage de l'hétérochromatine. L'extrémité libre s'épanouit après un étranglement placé au niveau de plusieurs bandes très colorées. Vers le milieu de ce chromosome on peut encore citer comme formation constante et facilement repérable le bulbe tronconique 3 E 4—3 E 5 dont la constriction proximale (3 E 6) porte 3 bandes discontinues de coloration intense.

L'élément 4 est le plus court (le «dot» excepté). Sa caractéristique globale réside dans sa grande richesse en bandes sombres et en capsules. L'extrémité proximale se trouve toujours enfouie dans le chromocentre, il en résulte une hétérochromatisation des premières bandes (4 H 1—2—3) et cette zone est particulièrement confuse. Signalons aussi la distorsion constante de la partie sombre de 4 E 2; sur les images les plus favorables on peut y dénombrer 4 bandes granulaires.

La plus forte densité en chromomères se situe vers l'extrémité libre (4 A 1 à 4 A 5) et suivant la qualité des préparations (ou l'état des noyaux) un certain nombre de capsules peuvent se résoudre en bandes de chromomères ou inversement.

En position normale, le chromosome 6 (le «dot») se trouve régulièrement incorporé au chromocentre, et non analysable. Rares sont

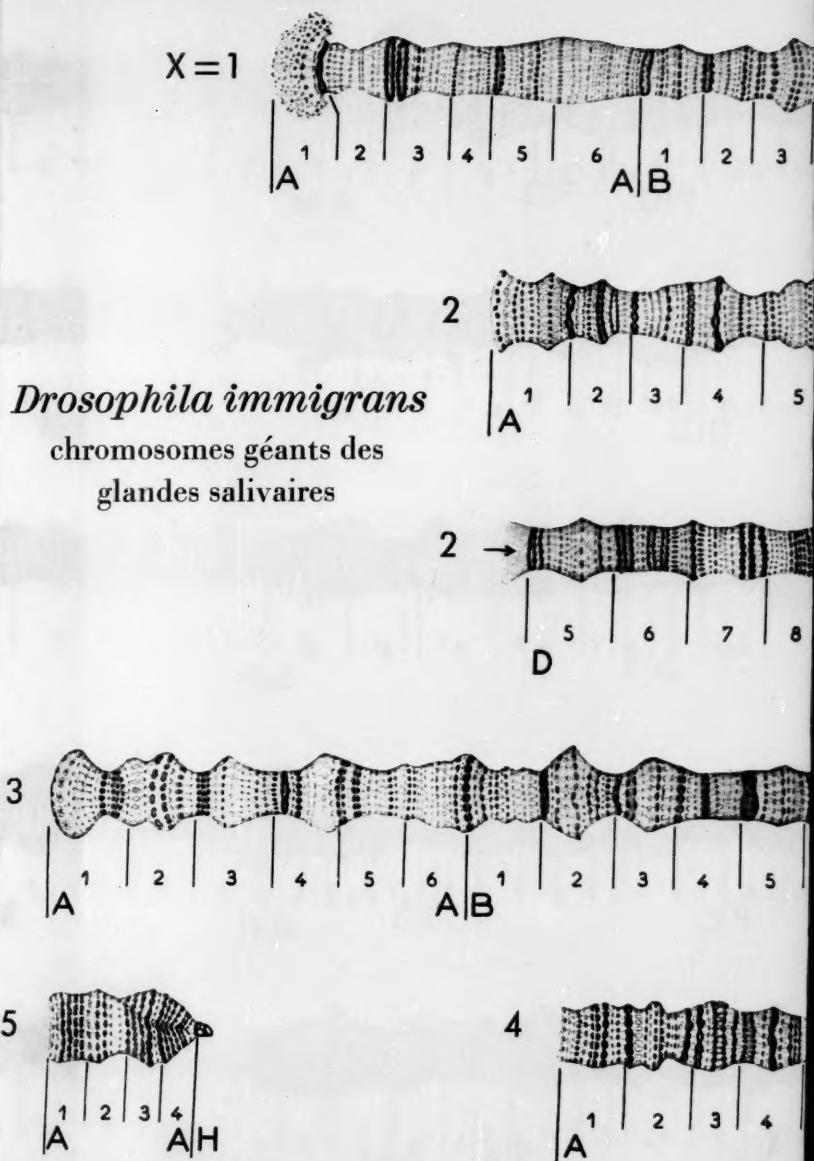
les noyaux où une lacération heureuse l'a libéré correctement de sa gangue. On peut alors compter une vingtaine de bandes réparties en deux groupes séparés par une région centrale plus claire. A quelques égards, ce «dot» ressemble un peu à celui de *D. virilis* (souche Henly): forme générale, répartition des chomomères, insertion au chromocentre par une extrémité conique. Le trop petit nombre de bonnes images de ce microchromosome ne permet pas d'affirmer la présence ou l'absence d'un second très court bras de l'autre côté du centromère.

#### Auteurs cités.

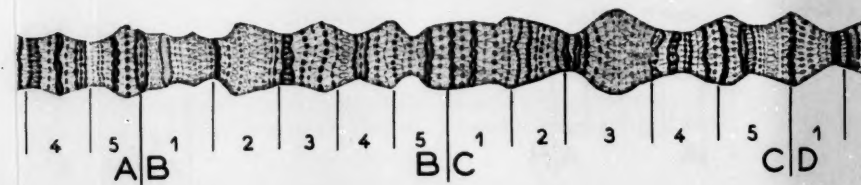
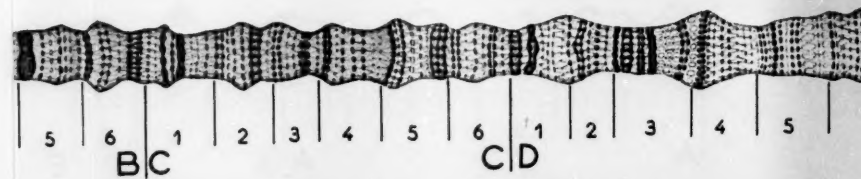
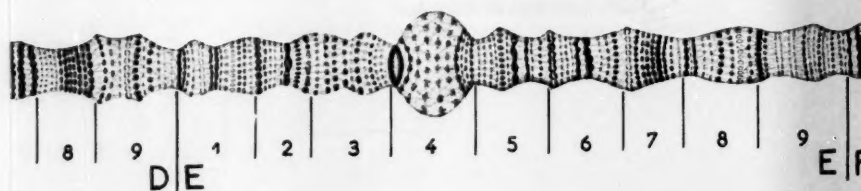
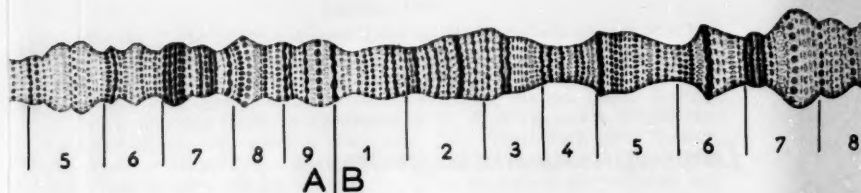
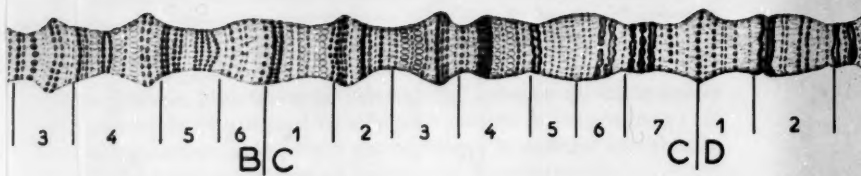
EMMENS, C. W.: The morphology of the nucleus in the salivary glands of four species of *Drosophila* (*D. melanogaster*, *D. immigrans*, *D. funebris*, *D. subobscura*). Z. Zellforsch. 26, 1—20 (1937). — LE CALVEZ, J.: Structure et comportement des chromosomes de *Drosophila immigrans* STURT., Ann. des Sci. natur. Zoologie, XI. s. 11, 237—254 (1949). — PATTERSON, J. T., W. STONE and A. B. GRIFFEN: Evolution of the *virilis* group in *Drosophila*. Univ. Texas Publ. 1940, No 4032, 218—250. — WARD, C. L.: Karyotype variation in *Drosophila*. Univ. Texas Publ. 1949, No 4920, 70—79. — WHARTON, L. T.: Analysis of the metaphase and salivary chromosome morphology within the genus *Drosophila*. Univ. Texas Publ. 1948, No 4313, 289—319.

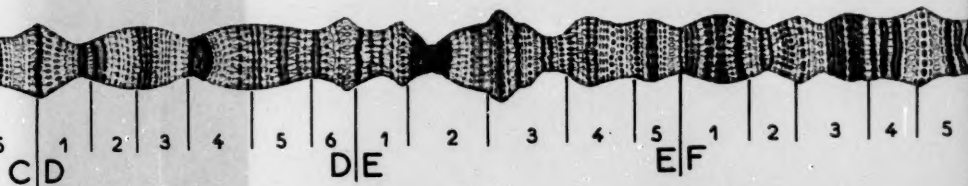
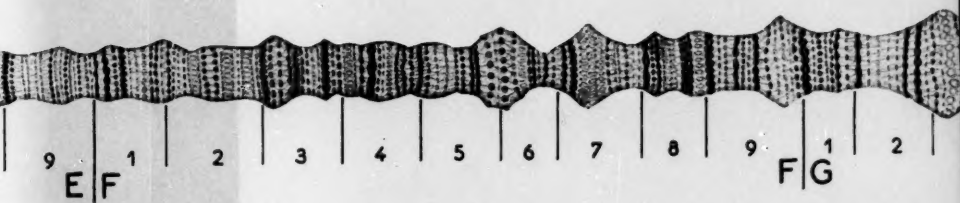
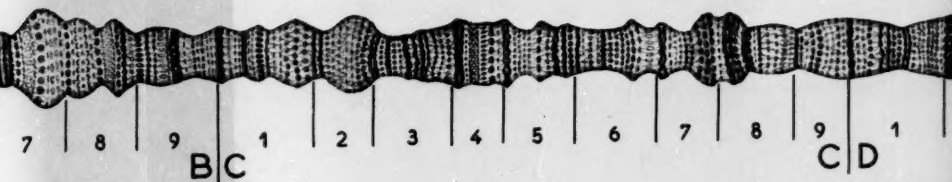
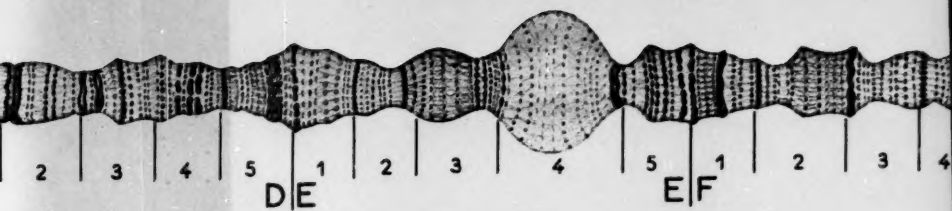
Prof. JEAN LE CALVEZ,

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences, Rennes.



J. LE CALVEZ, Carte cytologique des chromosomes géants des glandes salivaires de *Drosophila immigrans* Sturt.





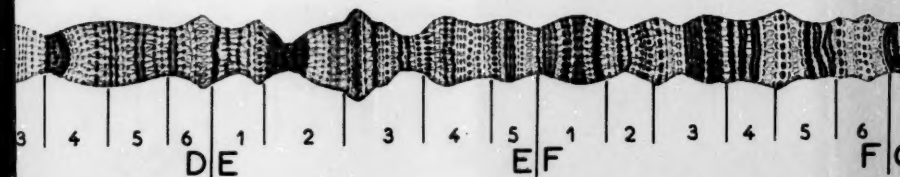
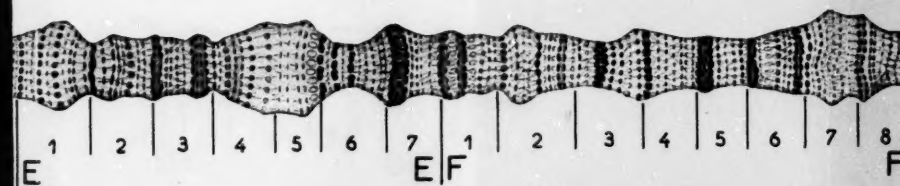
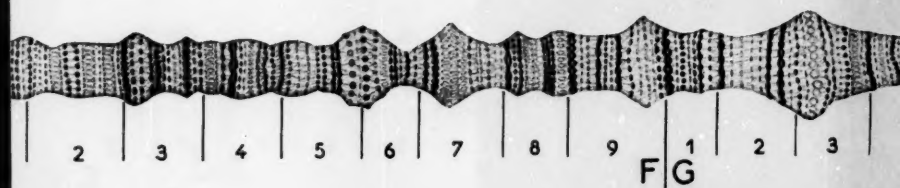
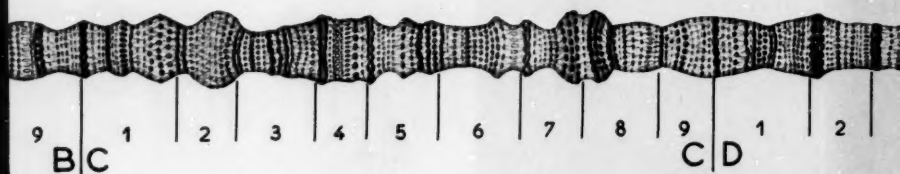
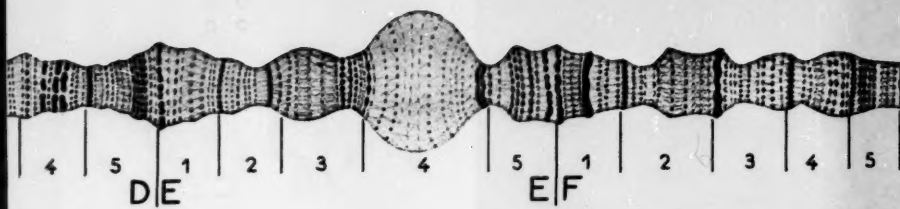
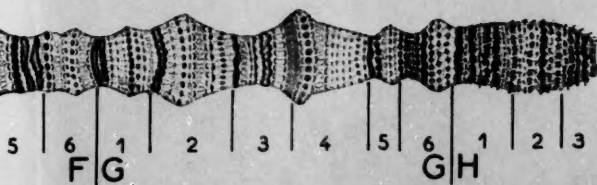
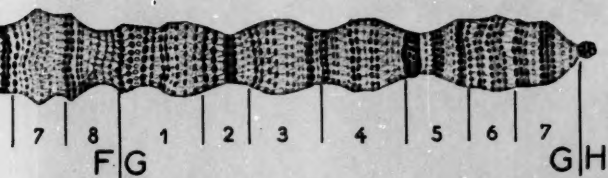
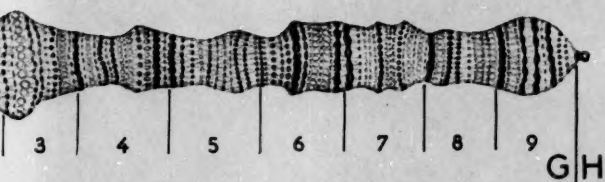
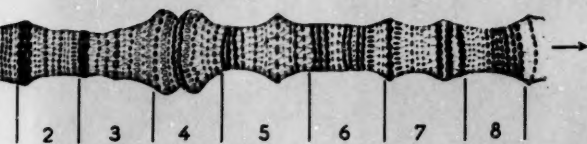
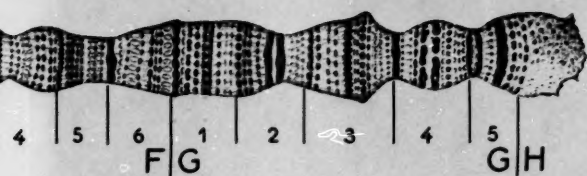
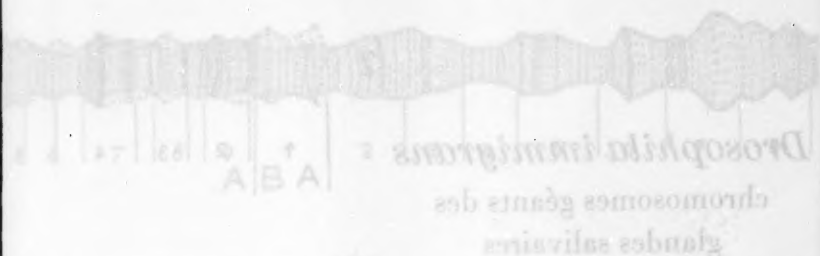




Planche I.





1. In diesem, durch Vergrößerung des Chromosoms erhaltenen, Bild  
sind die verschiedenen Chromosomen des Menschen dargestellt.

